

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局(43) 国際公開日  
2005年9月29日 (29.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2005/090405 A1(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C07K 16/28, A61K 39/395, A61P 1/04, 1/18, 13/12, 17/06, 19/02, 29/00, 31/04, 31/18, 35/00, 37/02, 37/06 // C12N 15/09, C12P 21/08

(74) 代理人: 青木 篤, 外(AOKI, Atsushi et al.); 〒1058423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/006229

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) 国際出願日: 2005年3月24日 (24.03.2005)

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ヨーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) 国際出願の言語: 日本語

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

(26) 国際公開の言語: 日本語

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(30) 優先権データ:  
特願2004-087578 2004年3月24日 (24.03.2004) JP

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および  
(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 加野 勝宏 (KANO, Katsuhiro) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP). 寺島 勇 (TERASHIMA, Isamu) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP).

A1

(54) Title: SUBTYPE OF HUMANIZED ANTIBODY AGAINST INTERLEUKIN-6 RECEPTOR

WO 2005/090405

(54) 発明の名称: インターロイキン-6受容体に対するヒト型化抗体のサブタイプ

(57) Abstract: As a subtype of humanized PM-1 antibody against interleukin-6 receptor (IL-6R), there is provided antibody subtype (1) whose one heavy chain C terminus consists of Pro-NH<sub>2</sub> (447). As another subtype of humanized PM-1 antibody against interleukin-6 receptor (IL-6R), there is provided antibody subtype (2) whose both heavy chain C termini consist of Pro-NH<sub>2</sub> (447). Furthermore, there are provided pharmaceutical compositions comprising these.(57) 要約: インターロイキン-6受容体 (IL-6R) に対するヒト型化PM-1抗体のサブタイプであって、片方の重鎖C末端がPro-NH<sub>2</sub> (447) である抗体サブタイプ (1)、及びインターロイキン-6受容体 (IL-6R) に対するヒト型化PM-1抗体のサブタイプであって、両方の重鎖C末端がPro-NH<sub>2</sub> (447) である抗体サブタイプ (2)、並びにこれらを含んで成る医薬組成物。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006229

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MERKLER et al., Recombinant type A rat 75-kDa alpha-amidating enzyme catalyzes the conversion of glycine-extended peptides to peptide amides via an alpha-hydroxyglycine intermediate, Arch.Biochem.Biophys., Vol.289, No.1, 15 August, 1991 (15.08.91), pages 192 to 196	1-6
Y	MILLER et al., Characterization of a bifunctional peptidylglycine alpha-amidating enzyme expressed in Chinese hamster ovary cells, Arch.Biochem.Biophys., Vol.298, No.2, 01 November, 1992 (01.11.92), pages 380 to 388	1-6
Y	RAY et al., Production of salmon calcitonin by direct expression of a glycine-extended precursor in Escherichia coli, Protein Expr. Purif., Vol.26, No.2, 2002.11, pages 249 to 259	1-6
Y	JP 2002-525104 A (SmithKline Beecham Corp.), 13 August, 2002 (13.08.02), Par. No. [0123] & WO 2000/018804 A1 & US 6365154 B1	1-6
Y	JP 06-319396 A (Japan Tobacco Inc.), 22 November, 1994 (22.11.94), Par. No. [0028] (Family: none)	1-6
Y	ADAMCZYK et al., Complete sequencing of anti-vancomycin fab fragment by liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry with a combination of database searching and manual interpretation of the MS/MS spectra, J.Immunol.Methods, Vol.260, No.1-2, 01 February, 2002 (01.02.02), pages 235 to 249	1-6
A	HIRATA et al., Characterization of IL-6 receptor expression by monoclonal and polyclonal antibodies, J.Immunol., Vol.143, No.9, 01 November, 1989 (01.11.89), pages 2900 to 2906	1-6

## 明 紹 書

## インターロイキン-6受容体に対するヒト型化抗体のサブタイプ

## 技術分野

本発明は、インターロイキン-6受容体（IL-6R）に対する抗体の一種であるヒト型化PM-1抗体の新規なサブタイプに関する。

## 背景技術

遺伝子組換えにより生産されたタンパク質は、理論上は、遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列を有するはずであるが、実際上は、種々の変異体が生産される場合がある。これは、既知の又は新規な生体内（転写後）修飾（modification）や自然発生の（非酵素的な）タンパク分解によるものである（R. J. Harris, *J. Chromatogr. A* 705 (1995) 129-134）。医薬品の成分として使用されるタンパク質は、生体による生合成過程を利用する遺伝子組換え法により生産されるため、分子構造が異なるサブタイプが生産される可能性がある。サブタイプの種類や含有量は医薬品の品質を規定するものであるので、サブタイプのプロファイルを特性解析し、医薬品組成物としての有用性を担保することが重要である。

IL-6はB細胞刺激因子2（BSF2）あるいはインターフェロン $\beta$ 2とも呼称されたサイトカインである。IL-6は、Bリンパ球系細胞の活性化に関する分化因子として発見され（Hirano, T. et al., *Nature* (1986) 324, 73-76）、その後、種々の細胞の機能に影響を及ぼす多機能サイトカインであることが明らかになった（Akira, S. et al., *Adv. in Immunology* (1993) 54, 1-78）。IL-6は、Tリンパ球系細胞の成熟化を誘導することが報告されている（Lotz, M.

et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258)。

IL-6は、細胞上で二種の蛋白質を介してその生物学的活性を伝達する。一つは、IL-6が結合する分子量約80kDのリガンド結合性蛋白質のIL-6受容体(IL-6R)である(Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981, Yamasaki, K. et al., Science (1987) 241, 825-828)。IL-6Rは、細胞膜を貫通して細胞膜上に発現する膜結合型の他に、主にその細胞外領域からなる可溶性IL-6Rとしても存在する。

抗IL-6R抗体に関しては、いくつかの報告がある(Novick, D. et al., Hybridoma (1991) 10, 137-146、Huang, Y. W. et al., Hybridoma (1993) 12, 621-630、国際特許出願公開番号WO 95-09873、フランス特許出願公開番号FR 2694767、米国特許番号US 521628)。その一つであるマウス抗体PM-1(Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906)の相捕性決定領域(CDR; complementarity determining region)をヒト抗体へ移植することにより得られたヒト型化PM-1抗体が知られている(国際特許出願公開番号WO 92-19759)。

しかしながら、ヒト型化PM-1抗体のサブタイプについては知られていない。

特許文献1: WO 92/19759

特許文献2: 特開平8-99902合公報

特許文献3: フランス特許出願公開番号FR 2694767

特許文献4: 米国特許番号US 521628

非特許文献1: R. J. Harris, J. Chromatogr. A 705 (1995) 129-134

非特許文献2: Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76

非特許文献3: Akira, S. et al., Adv. in Immunology (1993)

) 54, 1-78

非特許文献 4 : Lotz, M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258

非特許文献 5 : Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981

非特許文献 6 : Yamasaki, K. et al., Science (1987) 241, 8 25-828

非特許文献 7 : Novick, D. et al., Hybridoma (1991) 10, 13 7-146

非特許文献 8 : Huang, Y. W. et al., Hybridoma (1993) 12, 621-630

非特許文献 9 : Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906

## 発明の開示

従って、本発明はヒト型化PM-1抗体の新規なサブタイプ、及び当該サブタイプを含んで成る医薬組成物を提供するものである。

本発明者は、組換え生産されたヒト型化PM-1抗体を精密に分離した結果、ヒト型化PM-1抗体の重鎖を構成する定常領域のC-末端（448位）のGlyが欠落して447位のProがアミド化された分子種が存在し、且つ、抗体を構成する2本の重鎖の内、一方のみがアミド化されている抗体サブタイプ（サブタイプ1と称する）と両方がアミド化されている抗体サブタイプ（サブタイプ2と称する）が存在することを見出した。更に、本発明者は、上記いずれのサブタイプも、C-末端がGly（448）である生来型抗体と同等の抗原結合性及び細胞増殖阻害活性を有することを見出し、本発明を完成した。

従って、本発明は、インターロイキン-6受容体（IL-6R）に対する

るヒト型化PM-1抗体のサブタイプであって、片方の重鎖C末端がPr<sub>o</sub>-NH<sub>2</sub> (447) である抗体サブタイプ (1) 、及びインターロイキン-6受容体 (IL-6R) に対するヒト型化PM-1抗体のサブタイプであって、両方の重鎖C末端がPro-NH<sub>2</sub> (447) である抗体サブタイプ (2) を提供する。上記の両サブタイプに対応するヒト型化PM-1抗体の生来型の重鎖C末端はGly (448) である。好ましい態様において、アミド化された重鎖サブタイプに対応する生来の重鎖は、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を有する。好ましい一つの態様において、重鎖N末端のグルタミン (Gln) がピログルタミン酸 (pGlu) に変っている。また、好ましい態様において、本発明の抗体サブタイプを構成する軽鎖は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有する。

本発明はまた、上記のサブタイプ (1) もしくはサブタイプ (2) 又はサブタイプ (1) 及び (2) の両者を含んで成る医薬組成物を提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、ペプチド断片SLSLSPの液体クロマトグラフ (LC) - 質量分析 (MS) における液体クロマトグラフィーの結果を示し、上段は215nmの紫外線で検出したクロマトグラムを示し、下段はベースピーククロマトグラムを示す。

図2は、ペプチド断片SLSLSPの液体クロマトグラフ (LC) - 質量分析 (MS) におけるマススペクトルを示す。

図3は、ペプチド断片SLSLSPの液体クロマトグラフ (LC) - 質量分析 (MS) におけるズームスキャンスペクトルを示す。

図4は、ペプチド断片SLSLSP-NH<sub>2</sub>の液体クロマトグラフ (LC) - 質量分析 (MS) における液体クロマトグラフィーの結果を示し、上

段は215nmの紫外線で検出したクロマトグラムを示し、下段はベースピーククロマトグラムを示す。

図5は、ペプチド断片SLSLSP-NH<sub>2</sub>の液体クロマトグラフ (LC) - 質量分析 (MS) におけるマススペクトルを示す。

図6は、ペプチド断片SLSLSP-NH<sub>2</sub>の液体クロマトグラフ (LC) - 質量分析 (MS) におけるズームスキャンスペクトルを示す。

図7は、ペプチド断片SLSLSPとSLSLSP-NH<sub>2</sub>の混合溶液の、液体クロマトグラフ (LC) - 質量分析 (MS) における液体クロマトグラフィーの結果を示し、上段は215nmの紫外線で検出したクロマトグラムを示し、下段はベースピーククロマトグラムを示す。

図8は、図7における保持時間44分でのピークのマススペクトルを示す。

図9は、図7における保持時間51分でのピークのマススペクトルを示す。

図10において、Aは、ヒト型化PM-1抗体 (Main) を還元/カルボキシメチル化しトリプシン消化したペプチドのペプチドマップを示し；BにおいてSLSLSPG ( $m/z$  660.3±0.5における選択的モニタリング) の、CにおいてSLSLSP-NH<sub>2</sub> ( $m/z$  602.3±0.5における選択的モニタリング) の、そしてDにおいてSLSLSP ( $m/z$  603.3±0.5における選択的モニタリング) の分子量についてのMSクロマトグラムを示す。

図11は、ヒト型化PM-1抗体 (Main) を還元/カルボキシメチル化しトリプシン消化したペプチドのLC-MS/MS分析の結果を示し、上段は215nmの紫外線で検出したクロマトグラムを示し、下段はベースピーククロマトグラムを示す。

図12は、図11における保持時間50分でのピークのマススペクトルを示す。

図13は、図11と同じピークのズームスキャンスペクトルを示す。図14において、Aは、ヒト型化PM-1抗体サブタイプ1をトリプシン消化し、還元/カルボキシメチル化したペプチドのペプチドマップを示し；BにおいてSLSLSPG ( $m/z$  660.3±0.5における選択的モニタリング) の、CにおいてSLSLSP-NH<sub>2</sub> ( $m/z$  602.3±0.5における選択的モニタリング) の、そしてDにおいてSLSLSP ( $m/z$  603.3±0.5における選択的モニタリング) の分子量についてのMSクロマトグラムを示す。

図15は、ヒト型化PM-1抗体サブタイプ1を還元/カルボキシメチル化しトリプシン消化したペプチドのLC-MS/MS分析における液体クロマトグラフィー (LC) の結果 (図17のBのピークについて) を示し、の上段は215nmの紫外線で検出したクロマトグラムを示し、下段はベースピーククロマトグラムを示す。

図16は、図15における保持時間48分でのピークのマススペクトルを示す。

図17は、図16と同じピークのズームスキャンスペクトルを示す。

図18は、ヒト型化PM-1抗体サブタイプ1を還元/カルボキシメチル化し、トリプシン消化したペプチドのLC-MS/MS分析における液体クロマトグラフィー (LC) の結果 (図17のCのピークについて) を示し、上段は215nmの紫外線で検出したクロマトグラムを示し、下段はベースピーククロマトグラムを示す。

図19は、図18における保持時間46分でのピークのマススペクトルを示す。

図20は、図19と同じピークのズームスキャンスペクトルを示す。

図21において、Aは、ヒト型化PM-1抗体サブタイプ2を還元/カルボキシメチル化し、トリプシン消化したペプチドのペプチドマップを示し；BにおいてSLSLSPG ( $m/z$  660.3±0.5における選択的モ

ニタリング) の、CにおいてSLSLSP-NH<sub>2</sub> (m/z 602.3±0.5における選択的モニタリング) の、そしてDにおいてSLSLSP (m/z 603.3±0.5における選択的モニタリング) の分子量についてのMSクロマトグラムを示す。

図22は、ヒト型化PM-1抗体サブタイプ2を還元/カルボキシメチル化し、トリプシン消化したペプチドのLC-MS/MS分析における液体クロマトグラフィー (LC) の結果を示し、上段は215nmの紫外線で検出したクロマトグラムを示し、下段はベースピーククロマトグラムを示す。

図23は、図22における保持時間45分でのピークのマススペクトルを示す。

図24は、図23と同じピークのズームスキャンスペクトルを示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明の抗体サブタイプに対応する生来のヒト型化PM-1抗体は、IL-6Rに対する、PM-1と称するマウスモノクローナル抗体の重鎖 (H鎖) 及び軽鎖 (L鎖) を構成する可変領域 (V領域) 中の相補性決定領域 (CDR) を、ヒト抗体V領域の対応するCDR領域と置き換えたものである。前記マウス抗IL-6R抗体のL鎖V領域のCDRのアミノ酸配列は、国際公開WO 92/19759の表2のL<sub>v</sub>PM-1の行のCDR1、CDR2及びCDR3に記載されており、また、前記マウス抗IL-6R抗体のH鎖V領域のCDRのアミノ酸配列は、国際公開WO 92/19759の表3のH<sub>v</sub>P-1の行のCDR1、CDR2及びCDR3に記載されている。

上記ヒト型化PM-1抗体のL鎖V領域のフレームワーク領域 (FR) は、ヒト抗体REI由来のものが好ましく、そのアミノ酸配列は、国際公開WO 92/19759の表2のREIの行のFR1、FR2、FR3及びER4に記載されている。また、上記ヒト型化PM-1抗体のH鎖V領域のフレーム

ワーク領域 (FR) は、ヒト抗体NEW由来のものが好ましく、そのアミノ酸配列は、国際公開WO 92/19759の表3のNEWの行のFR1、FR2、FR3及びFR4に記載されている。

更に、上記の、ヒト抗体のFRとマウスPM-1抗体のCDRから構成されるV鎖の内、FR領域は、抗原結合性や中和活性の改善のため、種々改変されていても良く、例えば、L鎖V領域については、国際公開WO 92/19759の表2のRV<sub>L</sub>a及びRV<sub>L</sub>bの行のFR1、FR2、FR3及びFR4に記載されている（バージョンa及びバージョンbと称する）、また、H鎖V領域については、国際公開WO 92/19759の表3のRV<sub>H</sub>a～RV<sub>H</sub>fの行のFR1、FR2、FR3及びFR4に記載されている（バージョンa～バージョンfと称する）。

ヒト型化PM-1抗体のL鎖は、上に記載したL鎖V領域とヒト抗体L鎖の定常領域（C領域）とから成り、またヒト型化PM-1抗体のH鎖は、上に記載したH鎖V領域とヒト抗体H鎖の定常領域（C領域）とから成る。L鎖を構成するC領域としては、ヒト $\gamma$ -IC領域が好ましく、またH鎖を構成するC領域としては、ヒト $\kappa$ C領域が好ましい。

モノクローナル抗体のN末端アミノ酸のグルタミンはピログルタミル化することが知られており、本発明のヒト型化PM-1抗体のサブタイプ1及び2は、その重鎖のN末端のグルタミンがピログルタミル化されたものであってもよい。すなわち、本発明のヒト型化PM-1抗体のサブタイプ1及び2は、重鎖N末端のグルタミン（G1n）がピログルタミン酸（pGlu）である抗体サブタイプであってもよい。

こうして構成されるヒト型化PM-1抗体のL鎖及びH鎖としては上記の如く、FR領域の改変により種々のバージョンが存在するが、特に好ましい例として、配列番号：1に示すアミノ酸配列を有するH鎖、及び配列番号：2に示すアミノ酸配列を有するL鎖が挙げられ

る。

なお、モノクローナル抗体PM-1のL鎖V領域をコードするDNAを含んで成るプラスミドpPM-k3を含む大腸菌E. coli DH5  $\alpha$  pPM-k3はNCIMB 40366として、またモノクローナル抗体PM-1のH鎖V領域をコードするDNAを含んで成るプラスミドpPM-h1を含む大腸菌E. coli DH5  $\alpha$  pPM-h1はNCIMB 40362として、1991年2月12日に、National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (Ferguson Building, Craibstone Estate, Bucksburn, Aberdeen AB 21 9YA, United Kingdom) にブタペスト条約に基づき国際寄託されている。また、モノクローナル抗体PM-1を產生するハイブリドーマPM1は、FERM BP-2998として、1989年7月12日に、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）にブタペスト条約に基づき国際寄託されている。

上記の如きアミノ酸配列を有するL鎖又はH鎖をコードするDNAは、常法に従って構築することが出来る。具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域(FR; framework region)を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し產生させることにより得られる（欧洲特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 92-19759 参照）。

CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい

(Sato, K. et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856)。

ヒト型化抗体には、ヒト抗体C領域が使用される。ヒト抗体C領域としては、C $\gamma$ が挙げられ、例えば、C $\gamma$ 1、C $\gamma$ 2、C $\gamma$ 3又はC $\gamma$ 4を使用することができる。

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させたDNAあるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー(human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer)を挙げることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40(SV 40)等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロングーションファクター1 $\alpha$ (HEF1 $\alpha$ )などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV 40プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法(Mulligan, R. C. et al., *Nature* (1979) 277, 108-114)、また、HEF1 $\alpha$ プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushimaらの方法(Mizushima, S. and Nagata, S. *Nucleic Acids Res.* (1990) 18, 5322)に従えば容易に実施することができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモー

ター、araBプロモーターを挙げることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Ward, E. S. et al., *Nature* (1989) 341, 544-546; Ward, E. S. et al. *FASEB J.* (1992) 6, 2422-2427) 、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Better, M. et al. *Science* (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al. *J. Bacteriol.* (1987) 169, 4379-4383) を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド (refold) して使用する (例えば、W096/30394を参照)。

複製起源としては、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチングアミニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、*in vitro* および *in vivo* の産生系がある。*in vitro* の産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、又は真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Veroなど、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞

、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5 などが知られている。植物細胞としては、ニコチアナ・タバクム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 、糸状菌、例えばアスペルギルス属 (*Aspergillus*) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などが知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる產生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。

これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、*in vivo* にて抗体を產生してもよい。

一方、*in vivo* の產生系としては、動物を使用する產生系や植物を使用する產生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる產生系などがある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシなどを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、昆虫としては、カイコを用いることができる。植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。

これらの動物又は植物に抗体遺伝子を導入し、動物又は植物の体内で抗体を產生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギ  $\beta$  カゼインのような乳汁中に固有に產生される蛋白質をコードする遺伝子

の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., *Bio/Technology* (1994) 12, 699-702)。

また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウイルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Maeda, S. et al., *Nature* (1985) 315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターを *Agrobacterium tumefaciens* のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば *Nicotiana tabacum* に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24, 131-138)。

上述のように *in vitro* 又は *in vivo* の產生系にて抗体を產生する場合、抗体重鎖 (H鎖) 又は軽鎖 (L鎖) をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを单一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい (国際特許出願公開番号 WO 94-11523 参照)。

本発明のヒト型化PM-1抗体のサブタイプ1及び2を製造するには、宿主として動物の培養細胞、特に好ましくはCHO細胞を使用し、それを動物細胞培養用培地で培養するのが好ましい。また、タンパク質の加水分解物であるペプトンを含む培地が好ましく、牛肉、豚

肉、大豆、米、魚肉などに由来するペプトンが使用される。一般に動物由来ペプトンで発現効果が高く、また魚肉（例えば、カツオ）に由来するペプトンを用いると発現量に効果がある。この場合、哺乳動物性ペプトンを含む培地を用いてヒト型化PM-1抗体を製造する場合、サブタイプ1及び2の生成が殆ど見られず、魚肉由来ペプトンや植物性ペプトンなどを含む培地を用いてヒト型化PM-1抗体を製造する場合、サブタイプ1及び2の比率が高くなる。従って、本発明のヒト型化PM-1抗体のサブタイプ1又は2を製造するには、宿主として動物の培養細胞、特に好ましくはCHO細胞を使用し、それを魚肉由来ペプトンや植物由来ペプトンを含む培地で培養するのが特に好ましい。

前記のように產生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。プロテインAカラムに用いる担体として、例えば、Hyper D、P0ROS、Sephadex G-25等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

また、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、例えば、一般のカラムクロマトグラフィー、例えばイオノン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの組み合わせによって行うことが出来る。

更に、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用される抗体を分離、精製することができる

。これらのクロマトグラフィーはFPLC (Fast protein liquid chromatography) 或はHPLC (High performance liquid chromatography) に適用し得る。また、逆相HPLC (reverse phase HPLC) を用いてもよい。

上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又はELISA 等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、 PBS(-)で適当に希釈した後、280 nmの吸光度を測定し、1 mg/mL を約 1.35 OD として算出する。また、ELISA による場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M重炭酸緩衝液 (pH9.6) で 1 μg /mLに希釈したヤギ抗ヒトIgG (TAG製) 100 μLを96穴プレート (Nunc製) に加え、4 °Cで一晩インキュベーションし、抗体を固相化する。ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用される抗体又は抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG (CAPPAL製)100 μLを添加し、室温にて1時間インキュベーションする。

洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG (BIO SOURCE製) 100 μLを加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 製) を用いて405nm での吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

本願発明のヒト型化PM-1抗体のサブタイプは、生来のヒト型化PM-1抗体と実質的に同じ抗原結合性を有するため、生来のヒト型化PM-1抗体と同様にIL-6が関連する各種の疾患の治療または予防のために用いることが出来る。IL-6関連疾患の例としては、急性、慢性炎症性疾患、自己免疫疾患、例えば、腎炎、メサンギュウム増殖性腎炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、脾炎、小児慢性関節炎、または全身型若年性特発性関節炎、血管炎、川崎病、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、乾癬、シェーグレン症候群、成人スチル病；

腫瘍性疾患、例えば、多発性骨髄腫、キャッスルマン病、悪性リンパ腫、腎癌；感染症、例えば、HIV感染症、EBV感染症；悪液質；その他、プラズマサイトーシス、高イムノグロブリン症、貧血などがあげられ、好ましくは、慢性関節リウマチ、プラズマサイトーシス、高イムノグロブリン症、貧血、腎炎、悪液質、多発性骨髄腫、キャッスルマン病、メサンギュウム増殖性腎炎、全身性エリテマトーデス、クローン病、胰炎、乾癬、小児慢性関節炎、または全身型若年性突発性関節炎である。

本発明の医薬組成物は、経口的にまたは非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、胸腔内注射、腹腔内注射、皮下注射、坐薬、注腸、経口性腸溶剤などを選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1 kgあたり0.01 mg から100 mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1 ～1000 mg、好ましくは5～50mg の投与量を選ぶことができる。

好ましい投与量、投与方法は、たとえば抗IL-6レセプター抗体の場合には、血中にフリーの抗体が存在する程度の量が有効投与量であり、具体的な例としては、体重1 kgあたり1ヶ月（4週間）に0.5 mgから40mg、好ましくは1 mgから20mgを1回から数回に分けて、例えば2回／週、1回／週、1回／2週、1回／4週などの投与スケジュールで点滴などの静脈内注射、皮下注射などの方法で、投与する方法などである。投与スケジュールは、病状の観察および血液検査値の動向を観察しながら2回／週あるいは1回／週から1回／2週、1回／3週、1回／4週のように投与間隔を延ばしていくなど調整することも可能である。

本発明の医薬組成物は、投与経路次第で医薬的に許容される担体

や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される無機塩、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターーチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HS A）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

## 実施例

以下、実施例および参考例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

### 実施例 1. 生来のヒト型化PM-1抗体/サブタイプ1/サブタイプ2を含む抗体組成物の発現

#### 発現細胞の構築

##### (1) ヒトIL-6レセプター抗体PM-1の調製

Hirataらの方法 (J. Immunol., 143:2900-2906, 1989) により作成した抗IL-6R抗体MT18をCNBrにより活性化させたセファロース4B (Pharmacia Fine Chemicals製、Piscataway, NJ) と添付の処方にしたがって結合させ、IL-6R (Yamasakiら、Science 241:825-828, 1988) を精製した。

すなわち、ヒトミエローマ細胞株U266を1%ジギトニン（Wako Chemicals製）、10mMトリエタノールアミン（pH 7.8）および0.15M NaClを含む1mM p-パラアミノフェニルメタンスルフォニルフルオライドハイドロクロリド（Wako Chemicals製）（ジギトニン緩衝液）で可溶化し、セファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合した。その後、ビーズをジギトニン緩衝液で6回洗浄し、免疫に用いる部分精製IL-6Rとした。

BALB/cマウスを $3 \times 10^9$ 個のU266細胞から得た上記部分精製IL-6Rで10日おきに4回免疫し、その後常法によりハイブリドーマを作成した。成長陽性ウェルからのハイブリドーマ培養上清を下記の方法にてIL-6Rへの結合活性を調べた。 $5 \times 10^7$ 個のU266細胞を $^{35}$ S-メチオニン（2.5 mCi）で標識し、上記ジギトニン緩衝液で可溶化した。

可溶化したU266細胞を0.04mL容量のセファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合し、その後、ジギトニン緩衝液で6回洗浄し、0.25mLのジギトニン緩衝液（pH 3.4）により $^{35}$ S-メチオニン標識IL-6Rを流出させ、0.025mLの1M Tris（pH 7.4）で中和した。0.05mLのハイブリドーマ培養上清を0.01mLのProteinGセファロース（Phramacia製）と混合した。

洗浄した後、セファロースを上記で調製した0.005mLの $^{35}$ S標識IL-6R溶液とともにインキュベートした。免疫沈降物質をSDS-PAGEで分析し、IL-6Rと反応するハイブリドーマ培養上清を調べた。その結果、反応陽性ハイブリドーマクローンPM-1を樹立した。ハイブリドーマPM-1から產生されるIL-6R抗体PM-1は、IgG1 $\kappa$ 型のサブタイプを有する。

ハイブリドーマPM-1が產生する抗体のヒトIL-6Rに対するIL-6の結合阻害活性をヒトミエローマ細胞株U266を用いて調べた。ヒト組

換え型IL-6を大腸菌より調製し (Hiranoら、Immunol. Lett. , 17:41, 1988) 、ボルトンーハンター試薬 (New England Nuclear, Boston. MA) により  $^{125}$ I標識した (Tagaら、J. Exp. Med. 166:967, 1987) 。4  $\times 10^5$  個のU266細胞を、100倍量の過剰な非標識IL-6の存在下で室温にて、1時間、70% (v/v) のハイブリドーマPM-1の培養上清及び14000CPMの $^{125}$ I標識IL-6とともに培養した。70  $\mu$ Lのサンプルを400  $\mu$ Lのマイクロフュージポリエチレンチューブに入れた300  $\mu$ LのFCS上に重層し、遠心の後、細胞上の放射活性を測定した。その結果、ハイブリドーマPM-1が産生する抗体は、IL-6のIL-6Rに対する結合を阻害することが明らかとなった。

## (2) ヒト型化抗体hPM-1の作成

国際特許出願公開番号W092/19759号公報の実施例10に記載されたヒトエロンゲーションファクターI  $\alpha$ プロモーターを利用して、特開平8-99902号公報の参考例2に記載された方法に準じて、L鎖およびH鎖両遺伝子を含む单一の発現ベクターを作成し、この発現ベクターをCHO細胞に挿入することにより作製したヒト型化PM-1抗体（抗ヒトIL-6レセプター抗体）を産生するCHO細胞株を用いて試験した。得られたヒト型化抗体のヒトIL-6Rへの結合能はELISAにて確認した。さらに、hPM-1はマウス抗体およびキメラ抗体と同様に、ヒトIL-6のヒトIL-6Rへの結合を阻害した。

## 細胞培養とヒト型化PM-1抗体の発現

大量のヒト型化PM-1抗体を得るために、発現細胞を市販の無血清培地またはその改変培地で培養した。培養条件は、一般にCHO細胞の培養に適した環境で行った。培地中には目的抗体の発現量を増やすため、種々の添加物を加えることが可能であった。その中で、各種ペプトンは一般に広く用いられている。牛肉、豚肉、大豆、米、魚肉などに由来するペプトンが広く市販されているが、その効果は

細胞株との相性による。一般に動物由来ペプトンで発現効果が高い。各種ペプトンによる効果を調べる過程で、魚肉（カツオ）に由来するペプトンを用いると発現量に効果があることがわかった。

発現された抗体の精製は、一般的なカラムクロマトグラフィー、例えばアフィニティーコロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィーなどの組み合わせによって行った。魚肉に由来するペプトンを用いてCHO細胞を培養して発現されたヒト型化PM-1抗体の分子種に、牛肉由来ペプトンを用いた時には僅かしか見られない分子種が見られた。この分子種は、植物由来ペプトンを用いた場合にも見られた。

#### 実施例2. ヒト型化PM-1抗体サブタイプ1及びサブタイプ2の分析

##### 材料および方法

試料として、ヒト型化PM-1抗体の生来型（Mainと称する場合がある）、当該抗体のサブタイプ1及びサブタイプ2、並びに比較標準ペプチドとして、ヒト型化PM-1抗体のC-末端に存在し、C-末端のGlyが除去されたペプチドSer-Leu-Ser-Leu-Ser-Pro (SLSLSP) 及びそのC-末端Proがアミド化されたペプチドSLSLSP-NH<sub>2</sub>を使用した。ペプチドSLSLSP及びアミド化ペプチドSLSLSP-NH<sub>2</sub>は化学合成した。ヒト型化PM-1抗体 Main、当該抗体のサブタイプ1及びサブタイプ2は、実施例1で得たヒト型化PM-1抗体を、下記の方法で、カラムクロマトグラフィーにより分取、精製することにより得た。

カラムとしてPoly LC 製 Poly CAT A (100×4.6 mm)、ガードカラムとしてPoly LC 製Poly CAT A Javelin guard (10×4.0 mm)を使用した。移動相として、移動相A ( 0.05% NaN<sub>3</sub> を含むpH 6.1の25 mM 2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸緩衝液) 及び移動相B (2

50 mM 酢酸ナトリウムと0.05%  $\text{NaN}_3$  を含むpH 6.1の25 mM 2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸緩衝液) を使用した。グラジエント条件は、移動相Bの比率を、0分/35%、5分/35%、59分/60%、60分/100%とした。流速を1 mL/分とし、280nmにおける紫外可視吸光度により検出した。

#### ヒト型化PM-1抗体 Main、サブタイプ1及びサブタイプ2の酵素消化

200  $\mu\text{g}$ 相当量のヒト型化PM-1抗体 Main、サブタイプ1及びサブタイプ2を、それぞれ簡易限外濾過カートリッジ(ミニセント、東ソー製)に入れ、変性剤溶液(7 M グアニジン、1 mM エチレンジアミン四酢酸を含むpH 8.3の100 mM 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール-塩酸緩衝液)を加えて液量を500  $\mu\text{L}$ とした。カートリッジを5°Cで遠心し、液量を約50  $\mu\text{L}$ とした。マイクロチューブに試料を回収し、変性剤溶液(前記と同一組成)を加え全量を300  $\mu\text{L}$ とした。

各溶液にDTT溶液(162 mMジチオスレイトールを含む変性剤溶液)50  $\mu\text{L}$ を加えヘッドスペースを $\text{N}_2$ 置換し、恒温ブロック中37°Cで1時間放置した。さらに、IAA溶液(417 mMヨード酢酸を含む0.2 N水酸化ナトリウム溶液)45  $\mu\text{L}$ を加え、遮光下37°Cで30分間放置した。反応液を回収し、それぞれの試料について、透析チューブを用いてTris-HCl緩衝液(2 M尿素を含むpH 8.0の100 mM 2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール-塩酸緩衝液)500 mLに対し、5°Cで約20時間透析(透析膜:m.w. = 8000, スペクトラム製)を行なった。透析した試料を回収し、それぞれにトリプシン溶液(トリプシンをTris-HCl緩衝液(前記と同じ組成)に溶解し250 ng/ $\mu\text{L}$ とする)を20  $\mu\text{L}$ 加え、37 °Cで16時間放置した。

#### トリプシン処理物及び比較標準ペプチドの分析

上記の通りトリプシン処理した試料40  $\mu$ Lを液体クロマトグラフ - 質量分析 (LC-MS/MS) 測定に供した。標準ペプチド溶液、即ち、SLSLSP溶液 (SLSLSPを水に溶解し4  $\mu$ Mとする) 及び SLSLSP-NH<sub>2</sub>溶液 (SLSLSP-NH<sub>2</sub>を水に溶解し4  $\mu$ Mとする) については、50  $\mu$ Lを液体クロマトグラフ - 質量分析に供した。

液体クロマトグラフ条件は次の通りとした。即ち、カラムとしてワイエムシイ製YMC-Pack ODS (250×2.0 mm, 5  $\mu$ m, 300 Å)を使用した。移動相として、移動相A (0.1%トリフルオロ酢酸を含む5%アセトニトリル溶液) 及び移動相B (0.1%トリフルオロ酢酸を含む95%アセトニトリル溶液) を使用した。グラジエント条件は、移動相Bの比率を、0分/0%、10分/0%、120分/35%、140分/35%とした。流速を0.2 mL/分とし、215 nmにおける紫外可視吸光度により検出を行なった。

#### トリプシン処理物及び比較標準ペプチドの分析結果

##### (1) 比較標準ペプチド断片の測定

###### (a) ペプチド断片SLSLSPの測定

図1～図3は、ペプチド断片SLSLSPの液体クロマトグラフ (LC) - 質量分析 (MS) 結果を示す。図1の上段は215nmの紫外線で検出したクロマトグラムを示し、下段はベースピーククロマトグラムを示す。図2はマススペクトルを示し、そして図3はズームスキャンスペクトルを示す。得られた分子量 (602.2) は、理論値 (602.3; モノアイソトピック分子量) とほぼ一致した (図2及び図3)。

###### (b) ペプチド断片SLSLSP-NH<sub>2</sub>の測定

図4～6は、ペプチド断片SLSLSP-NH<sub>2</sub>の液体クロマトグラフ (LC) - 質量分析 (MS) 結果を示す。図4の上段は215nmの紫外線で検出したクロマトグラムを示し、下段はベースピーククロマトグラムを示す。図5はマススペクトルを示し、そして図6はズームスキャ

ンスペクトルを示す。得られた分子量（601.2）は、理論値（601.3；モノアイソトピック分子量）とほぼ一致した（図5及び図6）。

（c）ペプチド断片SLSLSPとSLSLSP-NH<sub>2</sub>の混合の測定

図7～9は、ペプチド断片SLSLSPとSLSLSP-NH<sub>2</sub>の混合溶液の、液体クロマトグラフ（LC）-質量分析（MS）結果を示す。図7の上段は215nmの紫外線で検出したクロマトグラムを示し、下段はベースピーククロマトグラムを示す。図8は、図7における保持時間44分でのピークのマススペクトルを示し、そして図9は、図7における保持時間51分でのピークのマススペクトルを示す。両ペプチド断片は上記の液体クロマトグラフィーの条件で完全に分離された。

（2）ヒト型化PM-1抗体のH鎖C末端構造の解析

（a）ヒト型化PM-1抗体（Main）のH鎖C末端構造の解析

図10のAにヒト型化PM-1抗体（Main）を還元/カルボキシメチル化し、トリプシン消化したペプチドのペプチドマップを示す。H鎖C末端断片の構造を調べるため、図10のBにおいてSLSLSPG（m/z 660.3±0.5における選択的モニタリング）の、図10のCにおいてSLSLSP-NH<sub>2</sub>（m/z 602.3±0.5における選択的モニタリング）の、そして図10のDにおいてSLSLSP（m/z 603.3±0.5における選択的モニタリング）の分子量についてのMSクロマトグラムを示す。SLSLSPGに相当するピークが49.7分に検出されたが、SLSLSP-NH<sub>2</sub>及びSLSLSPの分子量を持つペプチドフラグメントは存在しなかった。

図11～図13は、ヒト型化PM-1抗体（Main）を還元/カルボキシメチル化し、トリプシン消化したペプチドのLC-MS/MS分析の結果を示す。図11の上段は215nmの紫外線で検出したクロマトグラムを示し、下段はベースピーククロマトグラムを示す。図12は、図11における保持時間50分でのピークのマススペクトルを示し、そして図13は、図11と同じピークのズームスキャンスペクトルを示す。これらの

結果から、検出されたピークはアミノ酸配列SLSLSPGを持つ事が示された。従って、ヒト型化PM-1抗体（Main）の両方のH鎖C末端は-SLSLSPG配列を持つ事が示された。

（b）ヒト型化PM-1抗体サブタイプ1のH鎖C末端構造の解析

図14のAにヒト型化PM-1抗体サブタイプ1を還元/カルボキシメチル化し、トリプシン消化したペプチドのペプチドマップを示す。H鎖C末端断片の構造を調べるため、図14のBにおいてSLSLSPG（ $m/z$  660.3±0.5における選択的モニタリング）の、図14のCにおいてSLSLSP-NH<sub>2</sub>（ $m/z$  602.3±0.5における選択的モニタリング）の、そして図14のDにおいてSLSLSP（ $m/z$  603.3±0.5における選択的モニタリング）の分子量についてのMSクロマトグラムを示す。SLSLSPGに相当するピークが47.7 minに検出されたのに加え、SLSLSP-NH<sub>2</sub>に相当するピークも46.2 minに認められた。（図14のDにおいて分子量603.3のピークが46 min付近に認められたが、保持時間からSLSLSPではない。）

図15～図17は、ヒト型化PM-1抗体サブタイプ1を還元/カルボキシメチル化し、トリプシン消化したペプチドのLC-MS/MS分析の結果（図14のBのピークについて）を示す。図15の上段は215nmの紫外線で検出したクロマトグラムを示し、下段はベースピーククロマトグラムを示す。図16は、図15における保持時間48分でのピークのマススペクトルを示し、そして図17は、図16と同じピークのズームスキャンスペクトルを示す。

図18～図20は、ヒト型化PM-1抗体サブタイプ1を還元/カルボキシメチル化し、トリプシン消化したペプチドのLC-MS/MS分析の結果（図14のCのピークについて）を示す。図18の上段は215nmの紫外線で検出したクロマトグラムを示し、下段はベースピーククロマトグラムを示す。図19は、図18における保持時間46分でのピークのマ

スペクトルを示し、そして図20は、図19と同じピークのズームスキャンスペクトルを示す。

これらの結果から、検出されたピークはアミノ酸配列SLSLSPG及びSLSLSP-NH<sub>2</sub>を持つ事が示された。従って、ヒト型化PM-1抗体サブタイプ1のH鎖C末端の一方は-SLSLSPG、もう一方は-SLSLSP-NH<sub>2</sub>配列を持つ事が示された。

#### (c) ヒト型化PM-1抗体サブタイプ2のH鎖C末端構造の解析

図21のAにヒト型化PM-1抗体サブタイプ2を還元/カルボキシメチル化し、トリプシン消化したペプチドのペプチドマップを示す。H鎖C末端断片の構造を調べるため、図21のBにおいてSLSLSPG (m/z 660.3±0.5における選択的モニタリング) の、図21のCにおいてSLSLSP-NH<sub>2</sub> (m/z 602.3±0.5における選択的モニタリング) の、そして図21のDにおいてSLSLSP (m/z 603.3±0.5における選択的モニタリング) の分子量についてのMSクロマトグラムを示す。SLSLSPGに相当するピークが僅かに検出されたが、SLSLSP-NH<sub>2</sub>に相当するピークがより強く検出された。(図26のDにおいて分子量603.3のピークが45分付近に認められたが、保持時間から考えてSLSLSPではない。)

図22～図24は、ヒト型化PM-1抗体サブタイプ2を還元/カルボキシメチル化し、トリプシン消化したペプチドのLC-MS/MS分析の結果を示す。図22の上段は215nmの紫外線で検出したクロマトグラムを示し、下段はベースピーククロマトグラムを示す。図23は、図22における保持時間45分でのピークのマススペクトルを示し、そして図24は、図23と同じピークのズームスキャンスペクトルを示す。これらの結果から、検出されたピークはアミノ酸配列SLSLSP-NH<sub>2</sub>を持つ事が示された。従って、ヒト型化PM-1抗体サブタイプ2の両方のH鎖C末端は-SLSLSP-NH<sub>2</sub>配列を持つ事が示された。

実施例 3. ヒト型化PM-1抗体サブタイプ1及びサブタイプ2の生物活性の測定

(1) IL-6受容体結合活性の測定

(a) 測定方法

測定方法は、下記の工程により行なった。

- 1) pH 9.6の炭酸ナトリウム緩衝液を用いて5  $\mu$ g/mLに希釈した抗IL-6 レセプター抗体を、イムノプレートの各ウエルに100  $\mu$ Lずつ添加し、1晩以上冷所で放置する。
- 2) 各ウエルを0.05%ポリソルベート20を含むリン酸緩衝生理食塩水（以後RB）300  $\mu$ Lで3回洗浄する。
- 3) 各ウエルに1%の牛血清アルブミンを含むpH 8.1のトリス塩酸緩衝液（以後DB）200  $\mu$ Lを加え、室温で2時間以上放置する。
- 4) ウエル内の溶液を捨てた後、DBを用いて0.1  $\mu$ g/mLに希釈した可溶性IL-6受容体100  $\mu$ Lを各ウエルに添加し、室温で2時間放置する。
- 5) 各ウエルをRB 300  $\mu$ Lで3回洗浄する。
- 6) 一定のビオチン化MRAを含むDBを用いて段階希釈した試料溶液100  $\mu$ Lを各ウエルに添加し、室温で1時間放置する。
- 7) 各ウエルをRB 300  $\mu$ Lずつで3回洗浄する。
- 8) DBを用いて0.5  $\mu$ g/mLに希釈したアルカリリフォスファターゼ標識ストレプトアビジン100  $\mu$ Lを各ウエルに添加し、室温で1時間放置する。
- 9) イムノプレートの各ウエルをRB 300  $\mu$ Lで5回洗浄する。
- 10) 発色試薬 (SIGMA FAST p-Nitrophenyl Phosphate) を水で溶解し、各ウエルに100  $\mu$ L添加し、室温で30分間放置する。
- 11) 各ウエルの反応液の405 nmにおける吸光度と655nmにおける吸収度の差を求める。

12) 得られた吸光度から、平行線検定法（3+3）により各試料溶液の結合活性を算出する。

（b）結果

結果を下記の表1に示す。

表1

ヒト型化PM-1抗体サブタイプの抗原結合性

サブタイプ	活性	比活性
生来型（Main）	$1.04 \times 10^3$	100%
サブタイプ1	$1.13 \times 10^3$	109%
サブタイプ2	$1.12 \times 10^3$	108%

表1の結果から、ヒト型化PM-1抗体（Main）、サブタイプ1、およびサブタイプ2は、実質的に同じ抗原結合性をしめすことが明らかである。

（2）KT-3細胞増殖阻害

（a）測定方法

測定方法は下記の工程により行なった。

1) マイクロプレートの各ウェルに、RPMI培地で2 ng/mLに希釈したIL-6溶液50  $\mu$ Lを添加した後、RPMI培地で段階希釈した試料溶液を50  $\mu$ L加える。なお、ブランクのウェルにはRPMI培地50  $\mu$ Lを加える。

2) 更に、各ウェルにRPMI培地を用いて $5 \times 10^4$  cells/mLに調整したKT-3細胞浮遊液を100  $\mu$ L添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で3日間培養する。

3) 各ウェルに、RPMI培地で適当に希釈した<sup>3</sup>H-チミジン溶液50  $\mu$ Lを添加し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で6時間培養する。

4) マイクロプレート内の細胞を、セルハーベスターを用いてガラスフィルター上に捕集する。

5) ガラスフィルターを電子レンジを用いて10分間乾燥した後、ホットプレート等で加熱しながら固形シンチレーターをガラスフィルターに染み込ませる。

6) 液体シンチレーションカウンターを用いて放射活性 (cpm) を測定する。

7) 得られた放射活性から、平行線検定法 (4+4) により各試料溶液の生物活性を算出する。

結果を下記の表 2 に示す。

表 2

ヒト型化PM-1抗体サブタイプの細胞増殖阻害活性

サブタイプ	活性	比活性
生来型 (Main)	$1.00 \times 10^3$	100%
サブタイプ 1	$1.02 \times 10^3$	102%
サブタイプ 2	$1.01 \times 10^3$	101%

表 2 の結果から、ヒト型化PM-1抗体 (Main) 、サブタイプ 1 、およびサブタイプ 2 は、実質的に同じ細胞増殖阻害活性を示すことが明らかである。

## 請求の範囲

1. インターロイキン-6受容体(IL-6R)に対するヒト型化PM-1抗体のサブタイプであって、片方の重鎖C末端がPro-NH<sub>2</sub>(447)である抗体サブタイプ(1)。
2. インターロイキン-6受容体(IL-6R)に対するヒト型化PM-1抗体のサブタイプであって、両方の重鎖C末端がPro-NH<sub>2</sub>(447)である抗体サブタイプ(2)。
3. 請求項1又は2に記載のサブタイプに対応するヒト型化PM-1抗体の生来型の重鎖が、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を有する、請求項1又は2に記載の抗体サブタイプ。
4. 重鎖N末端のグルタミン(Gln)がピログルタミン酸(pGlu)である、請求項3に記載の抗体サブタイプ。
5. 前記ヒト型化PM-1抗体サブタイプの軽鎖が、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有する、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体サブタイプ。
6. 請求項1～5のいずれか1項に記載の、サブタイプ(1)もしくはサブタイプ(2)、又はサブタイプ(1)及び(2)の両者を含んで成る医薬組成物。

Fig.1

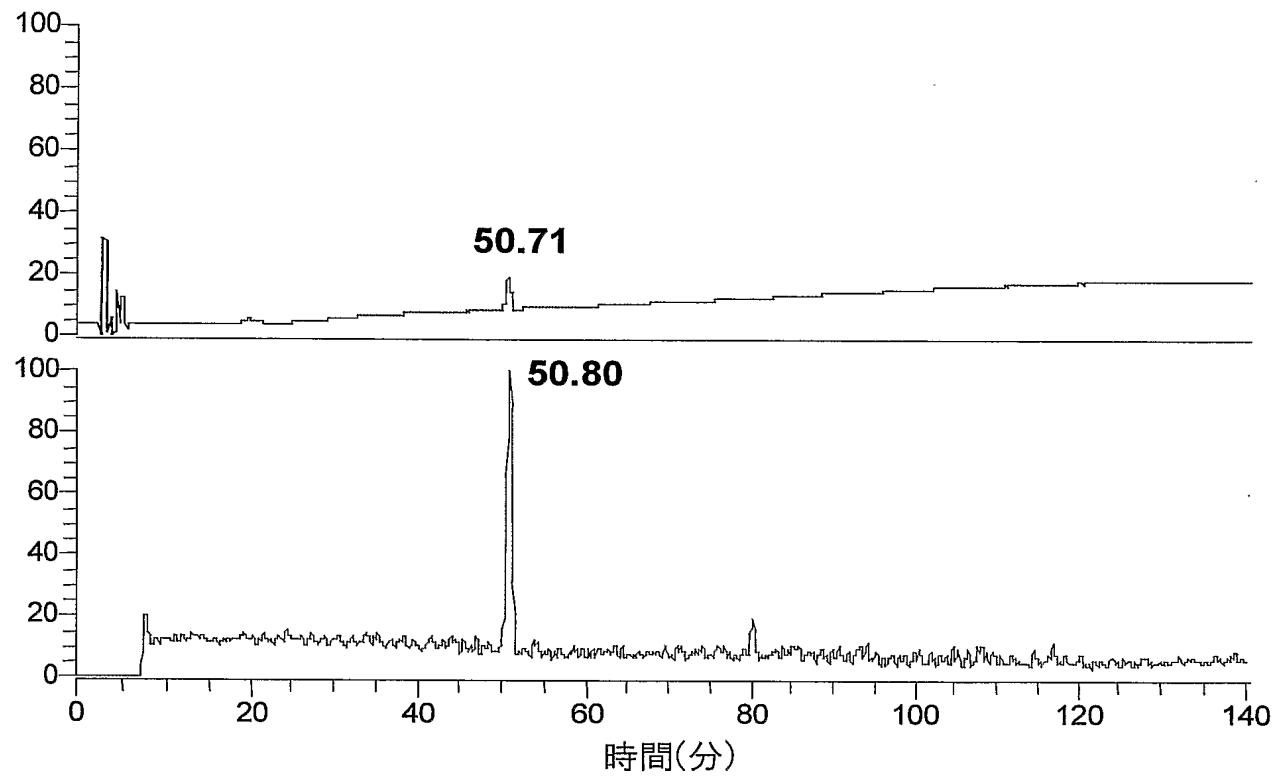


Fig. 2

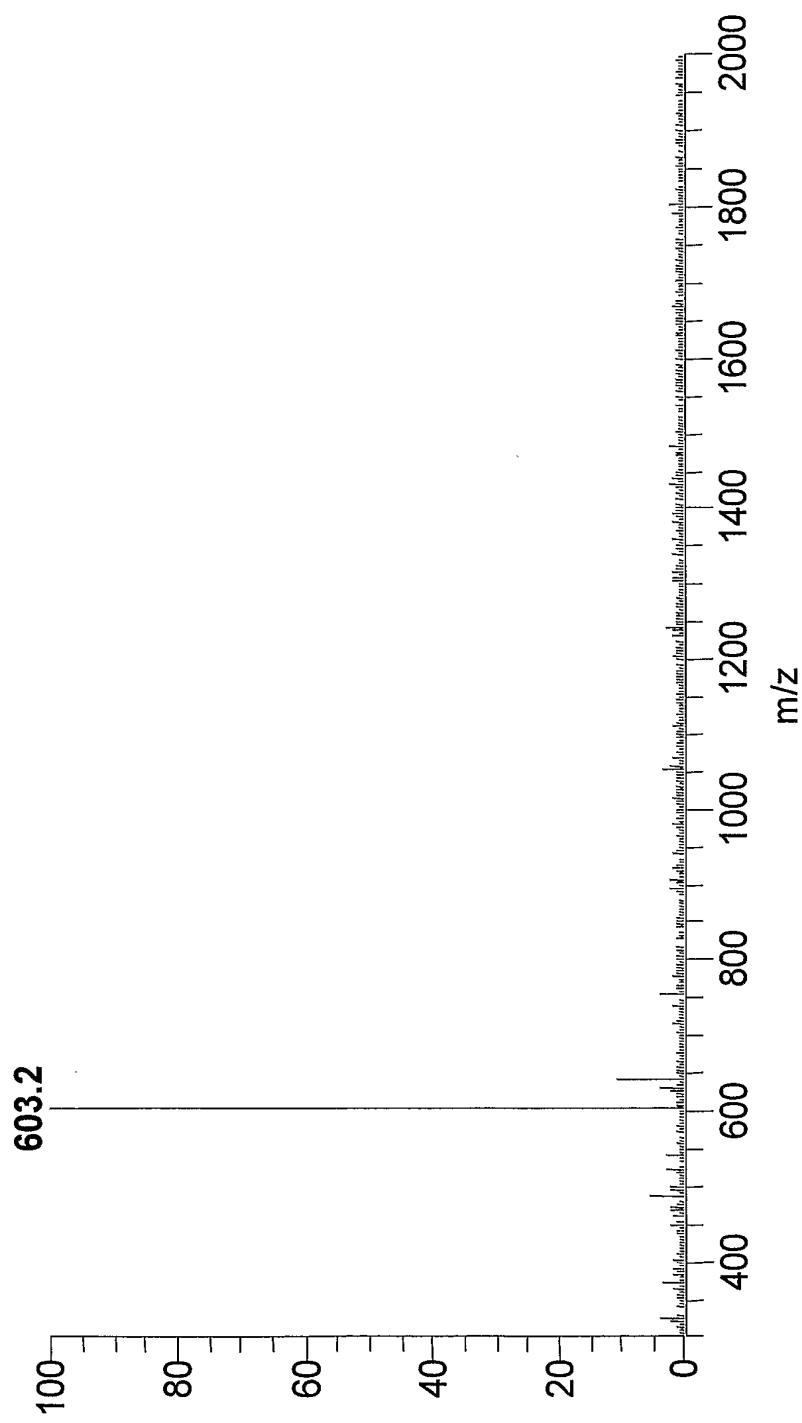


Fig. 3

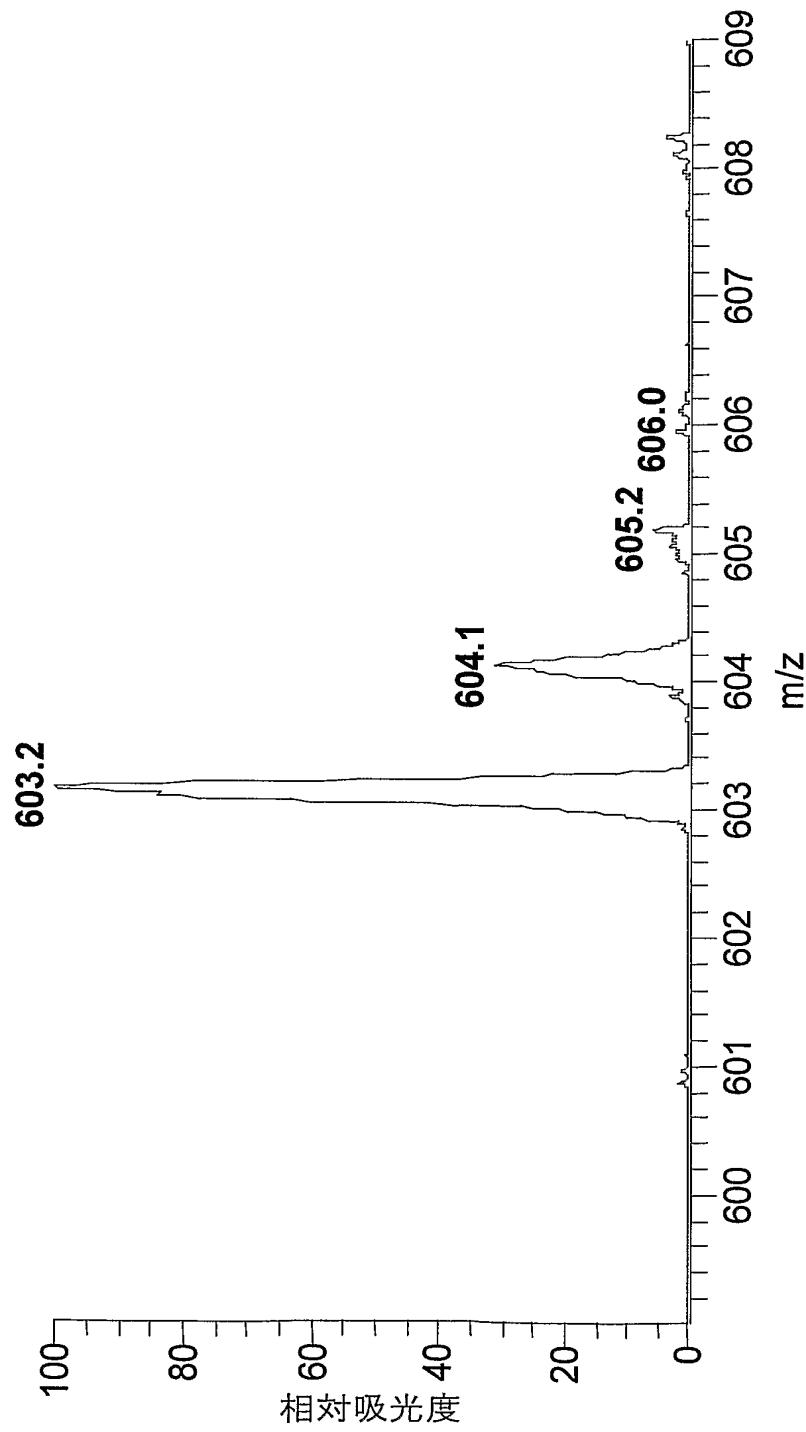


Fig. 4

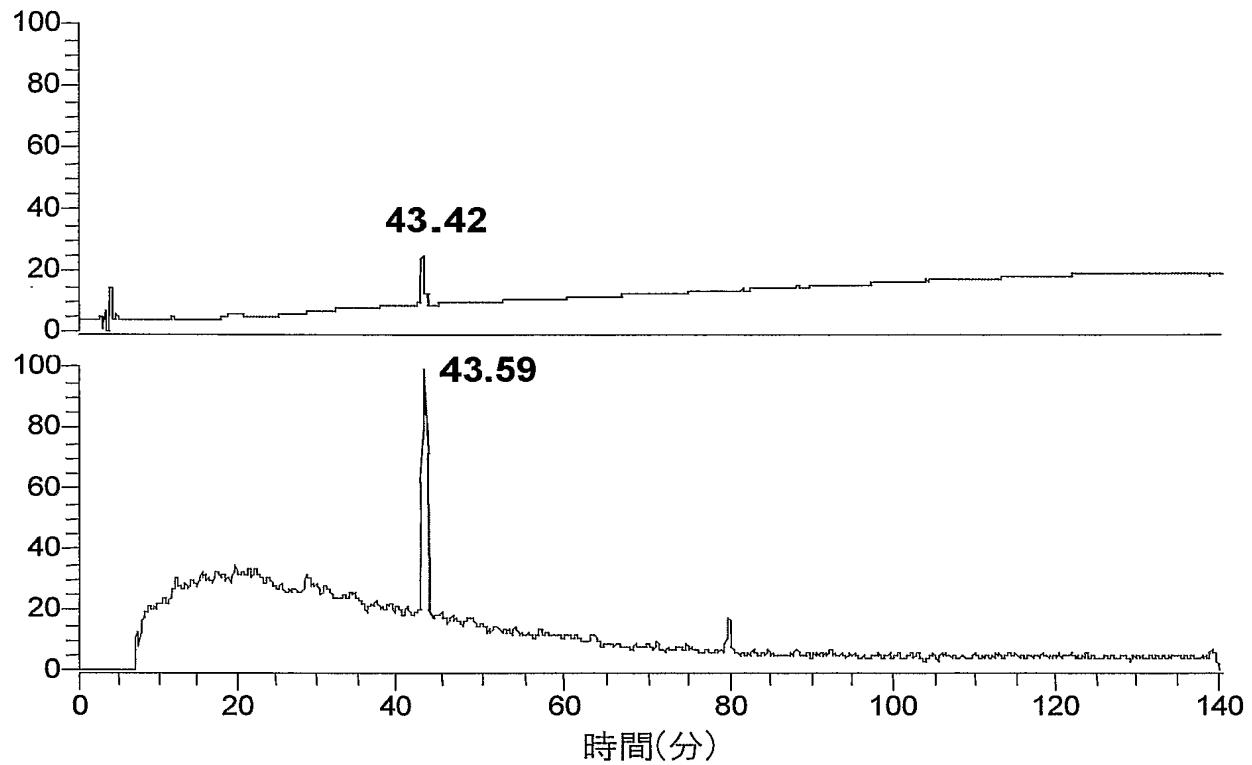


Fig. 5

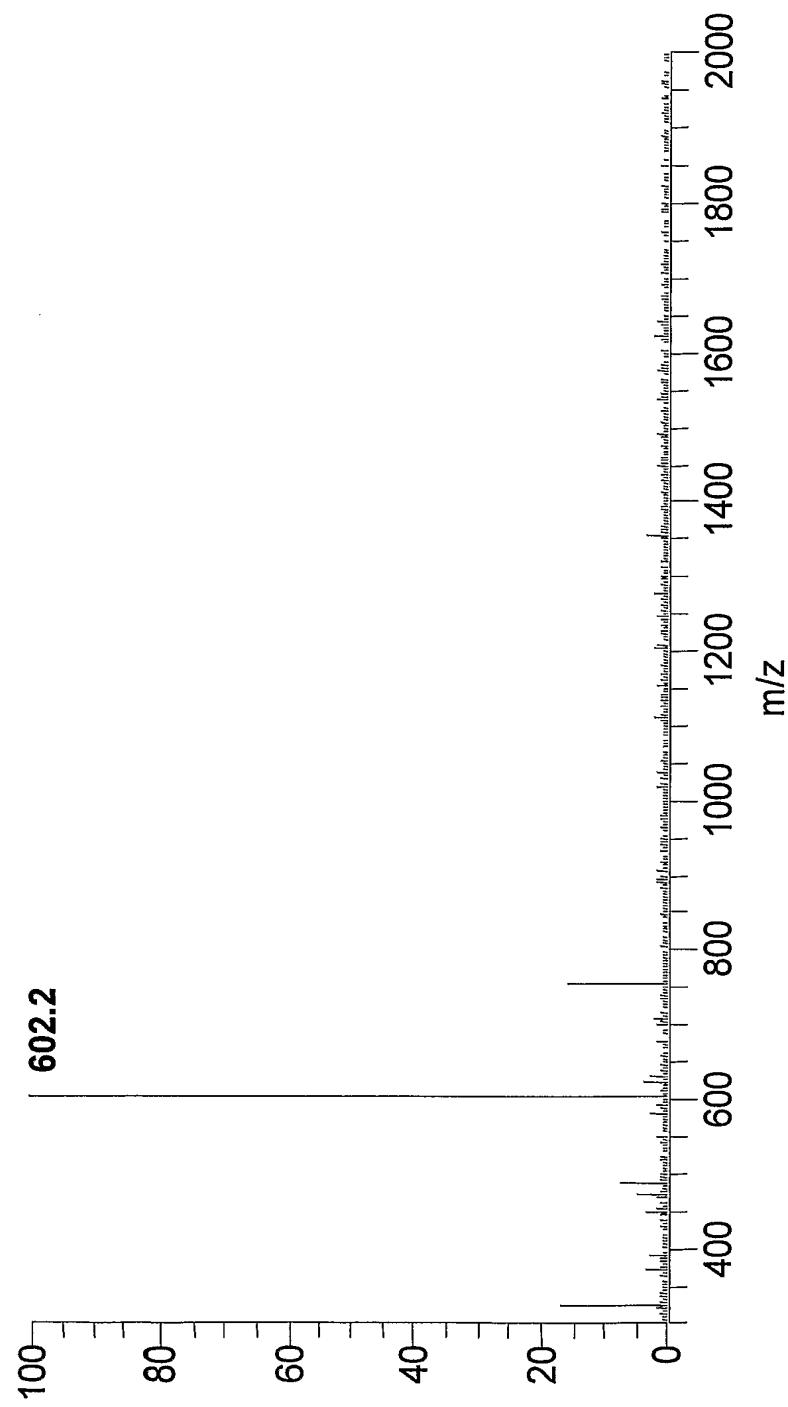


Fig. 6

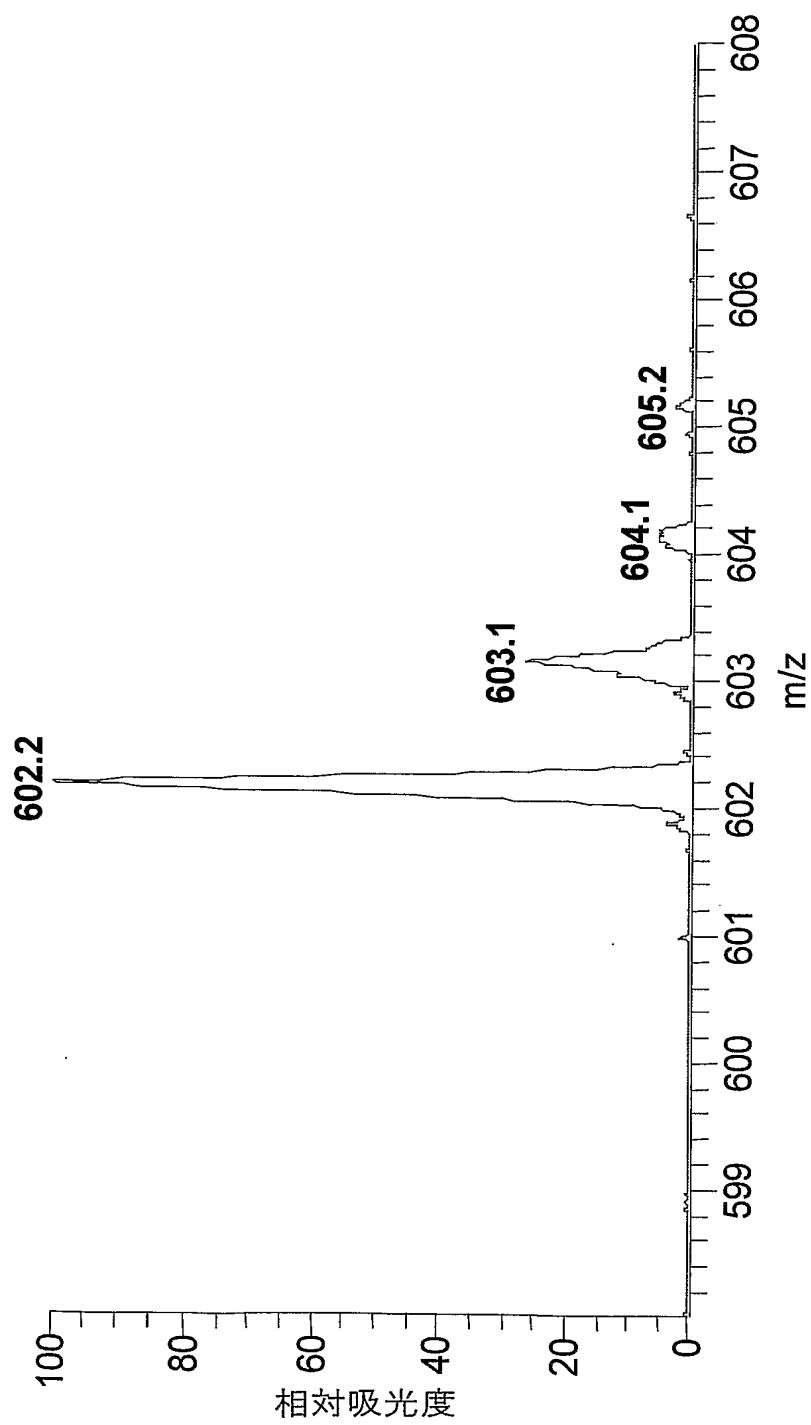


Fig. 7

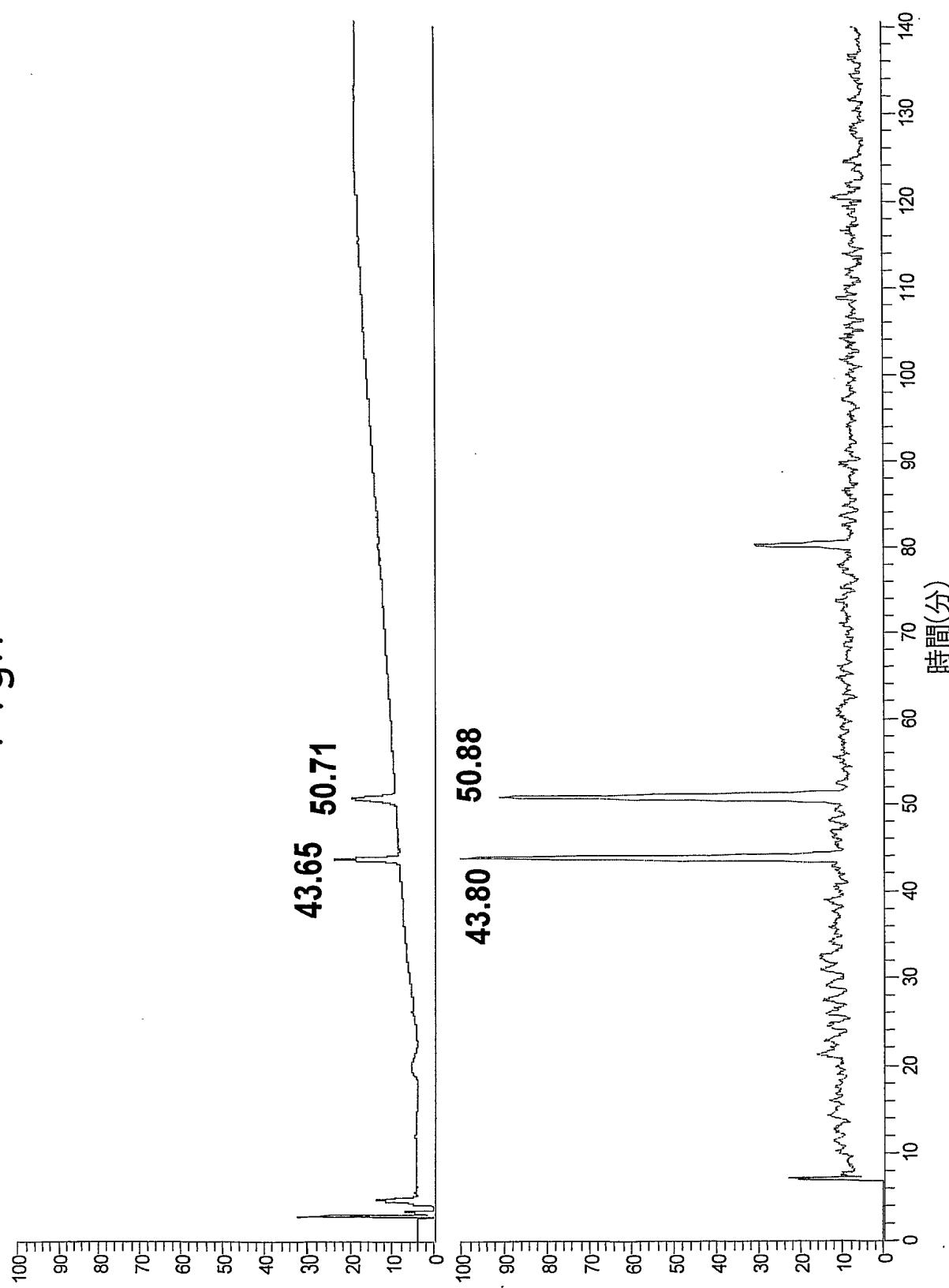


Fig. 8

602.3

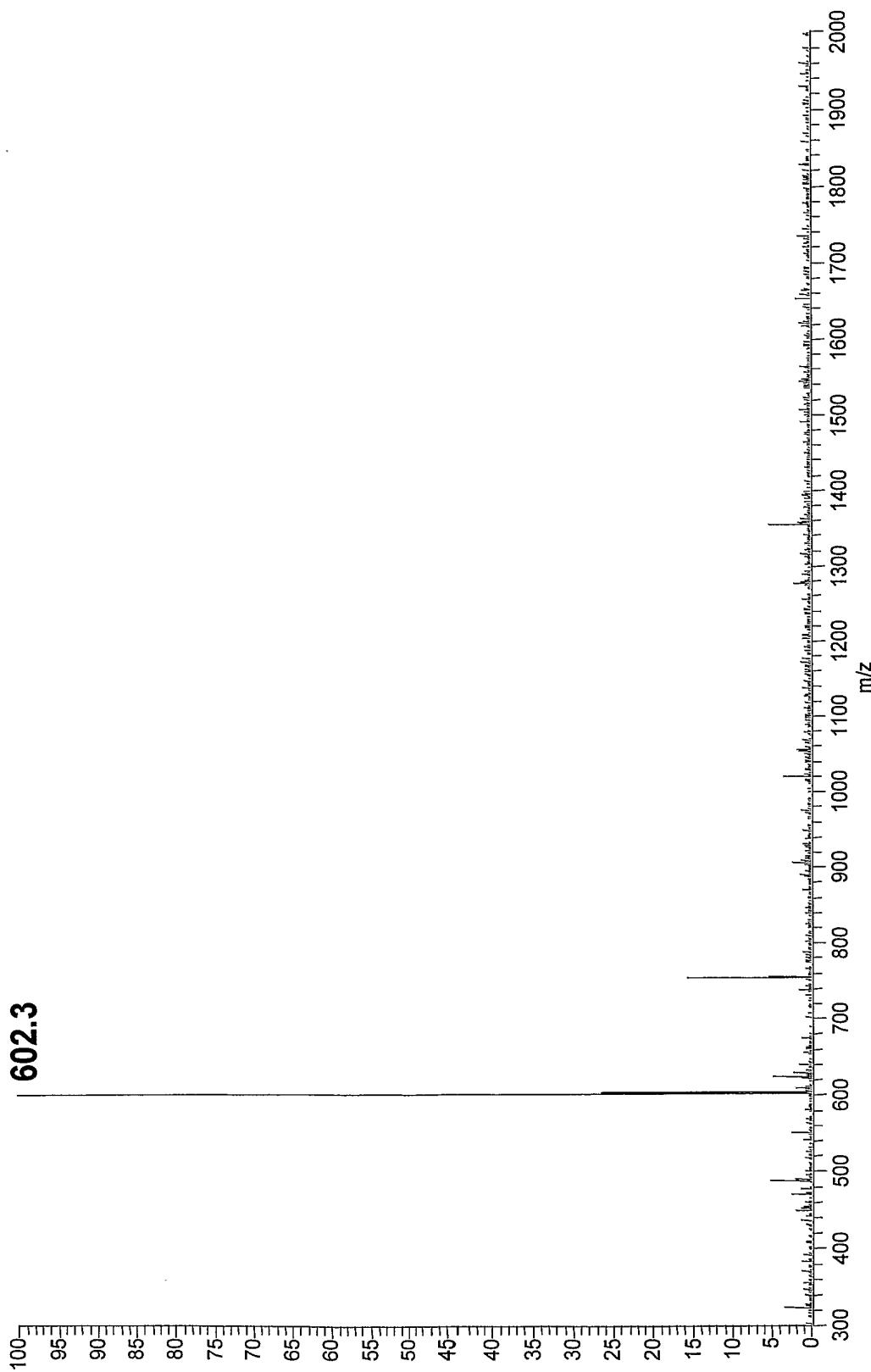


Fig. 9

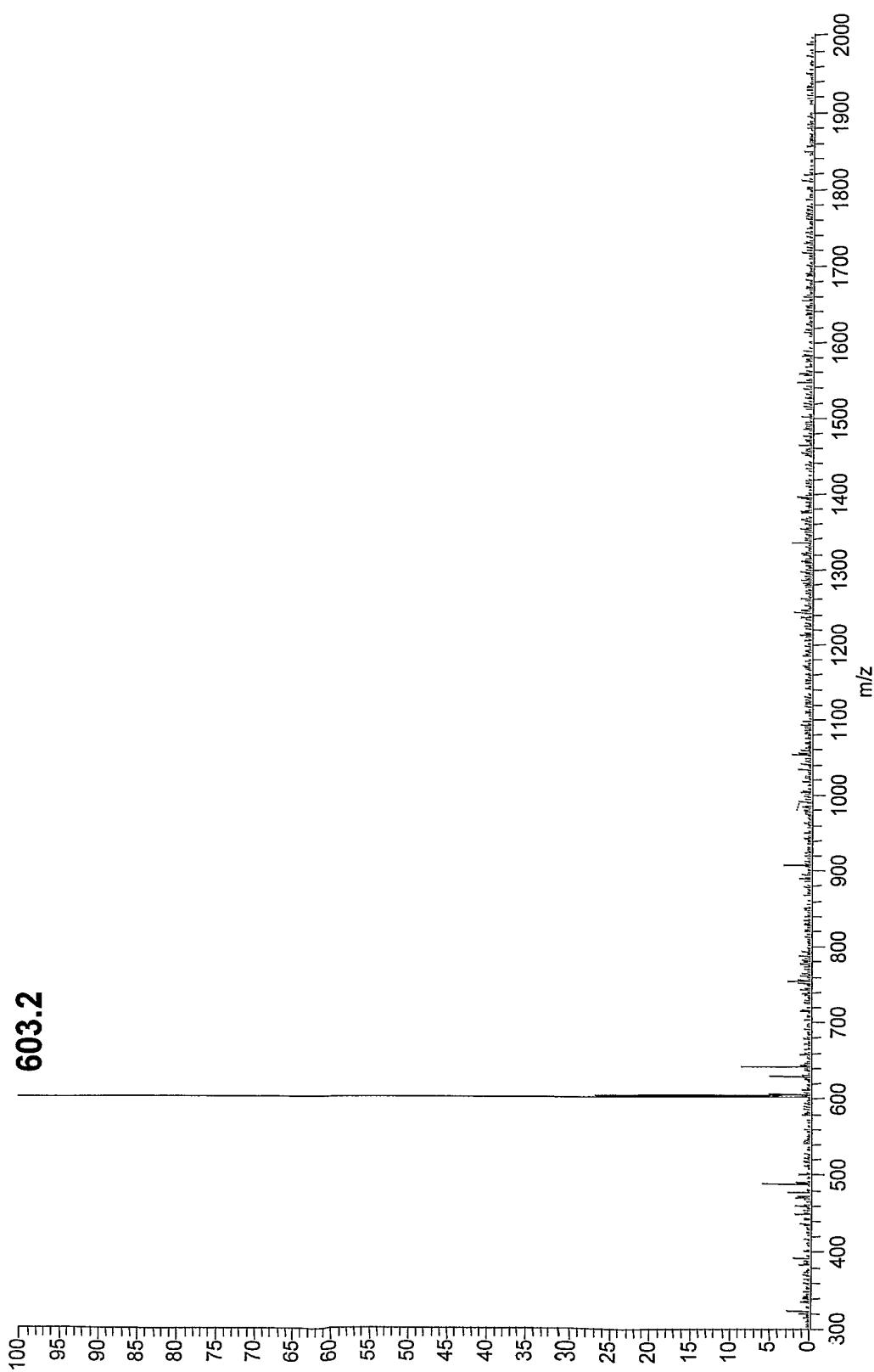


Fig. 10

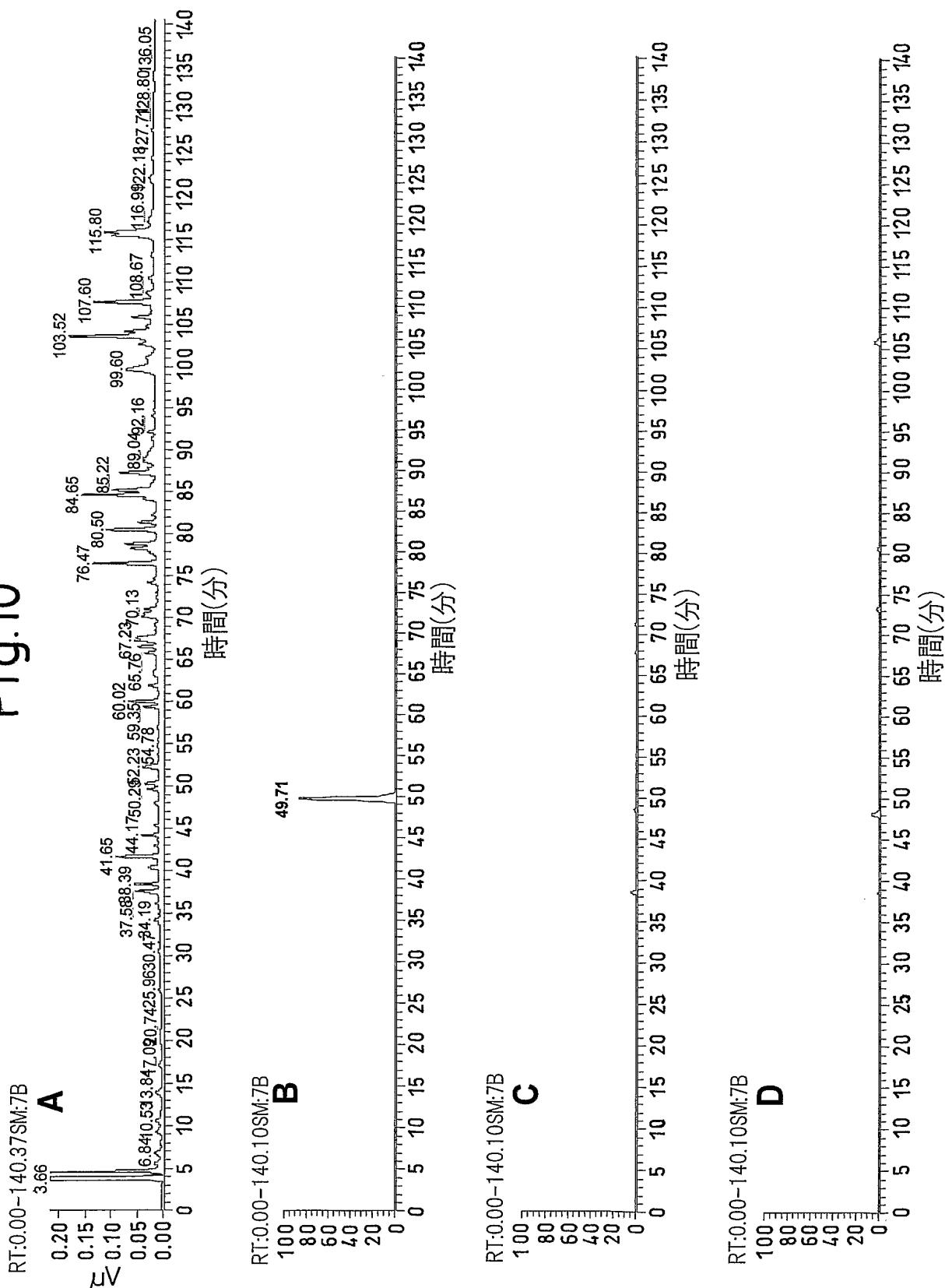


Fig.11

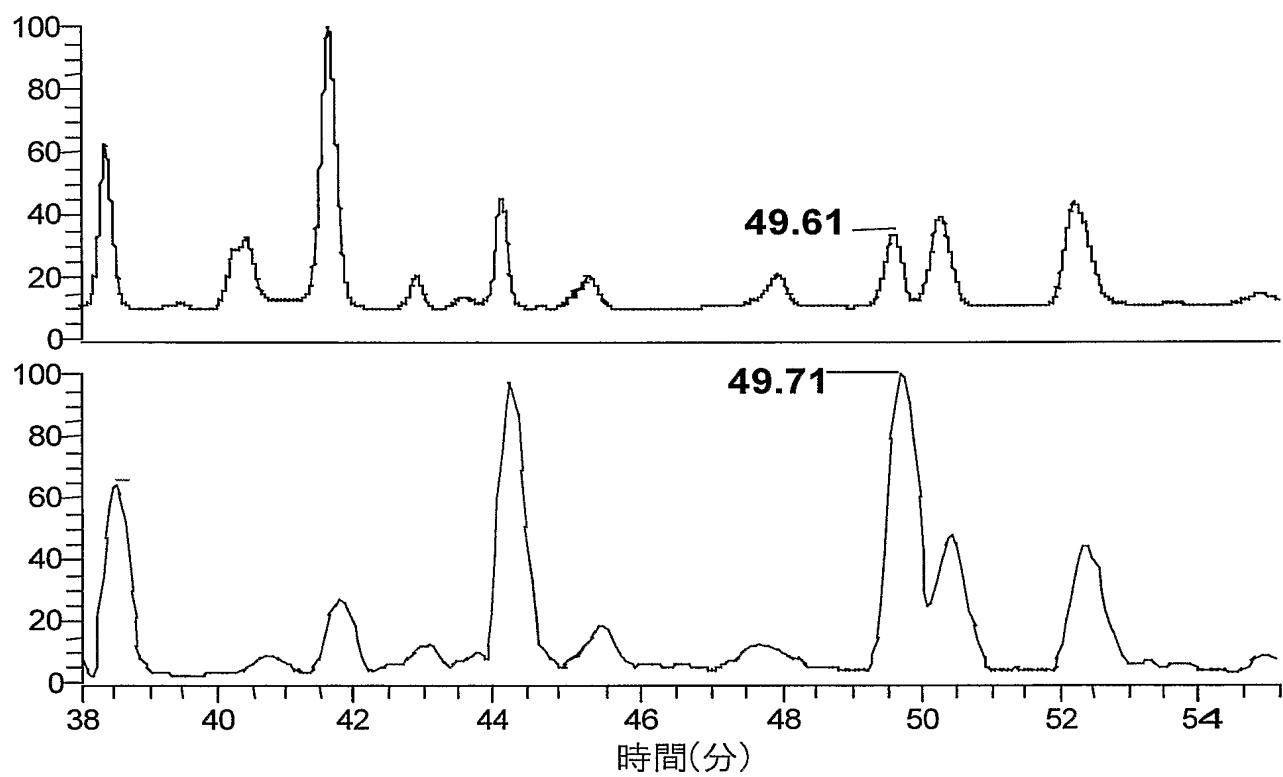


Fig.12

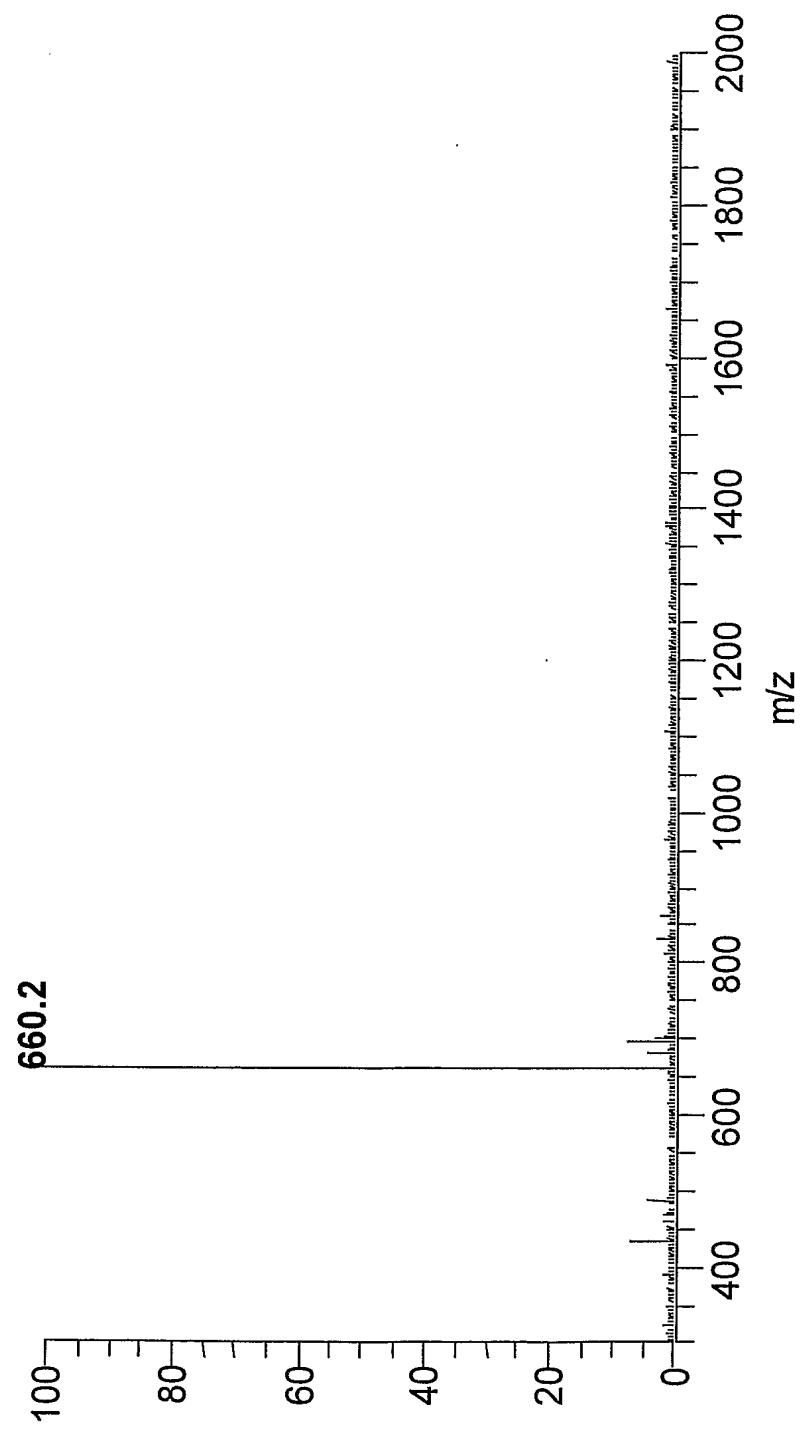


Fig.13

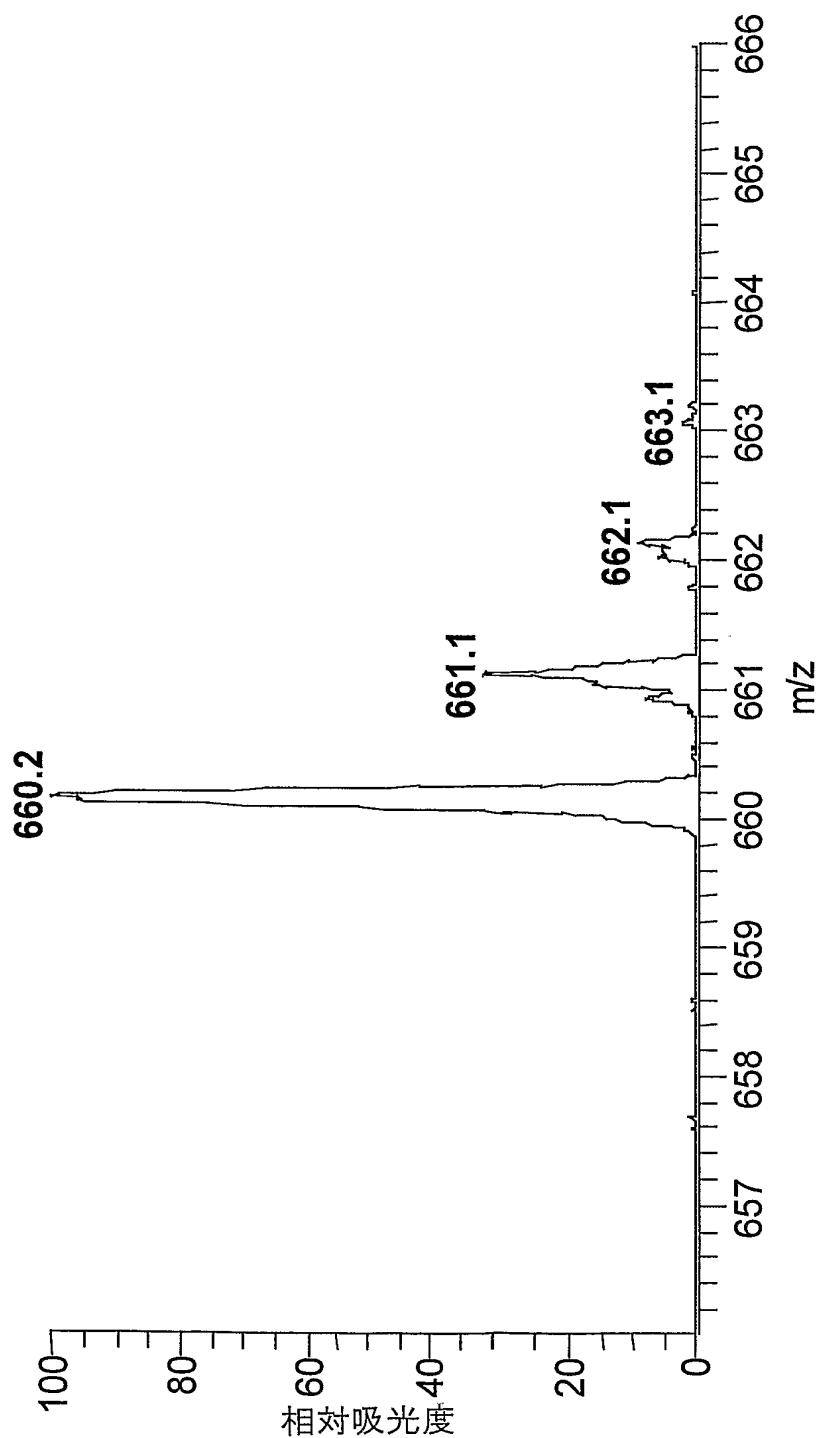


Fig.14

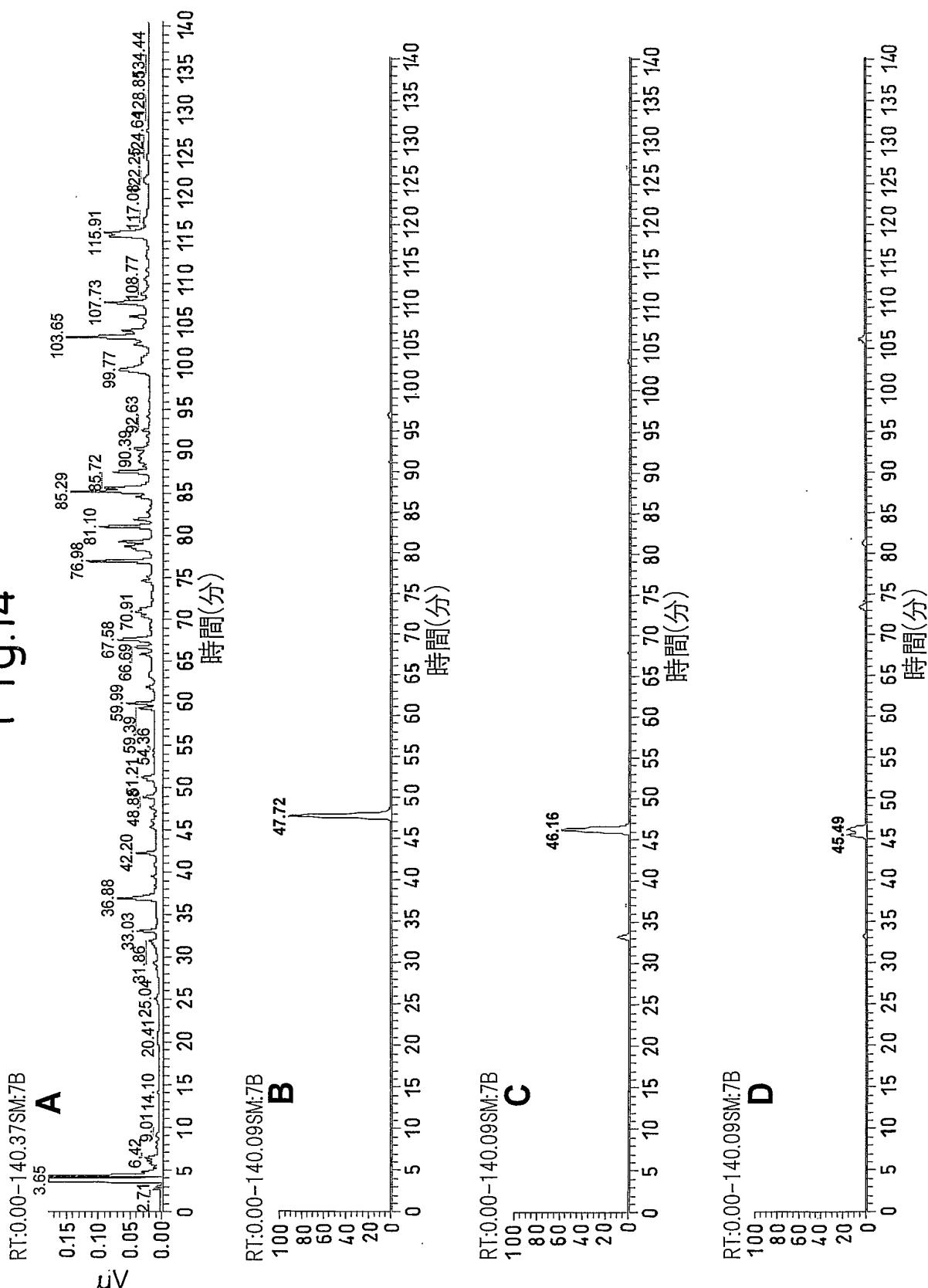


Fig.15

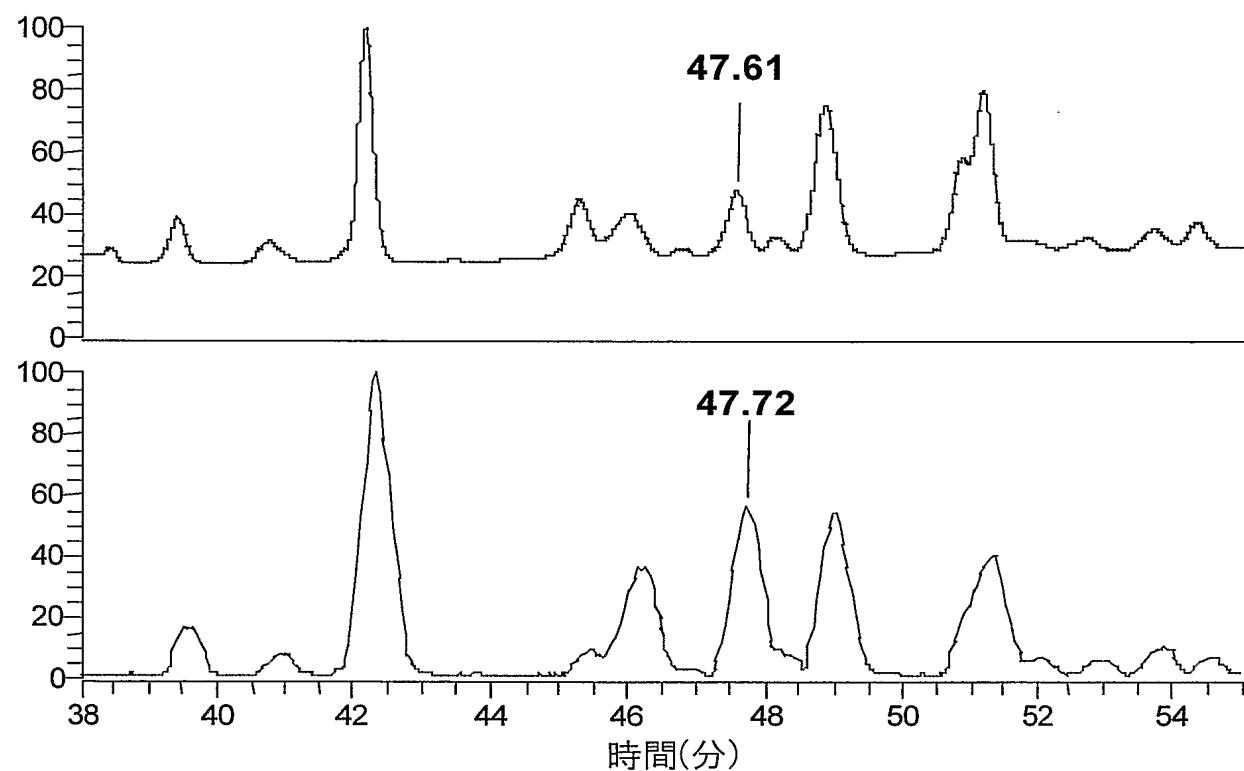


Fig.16

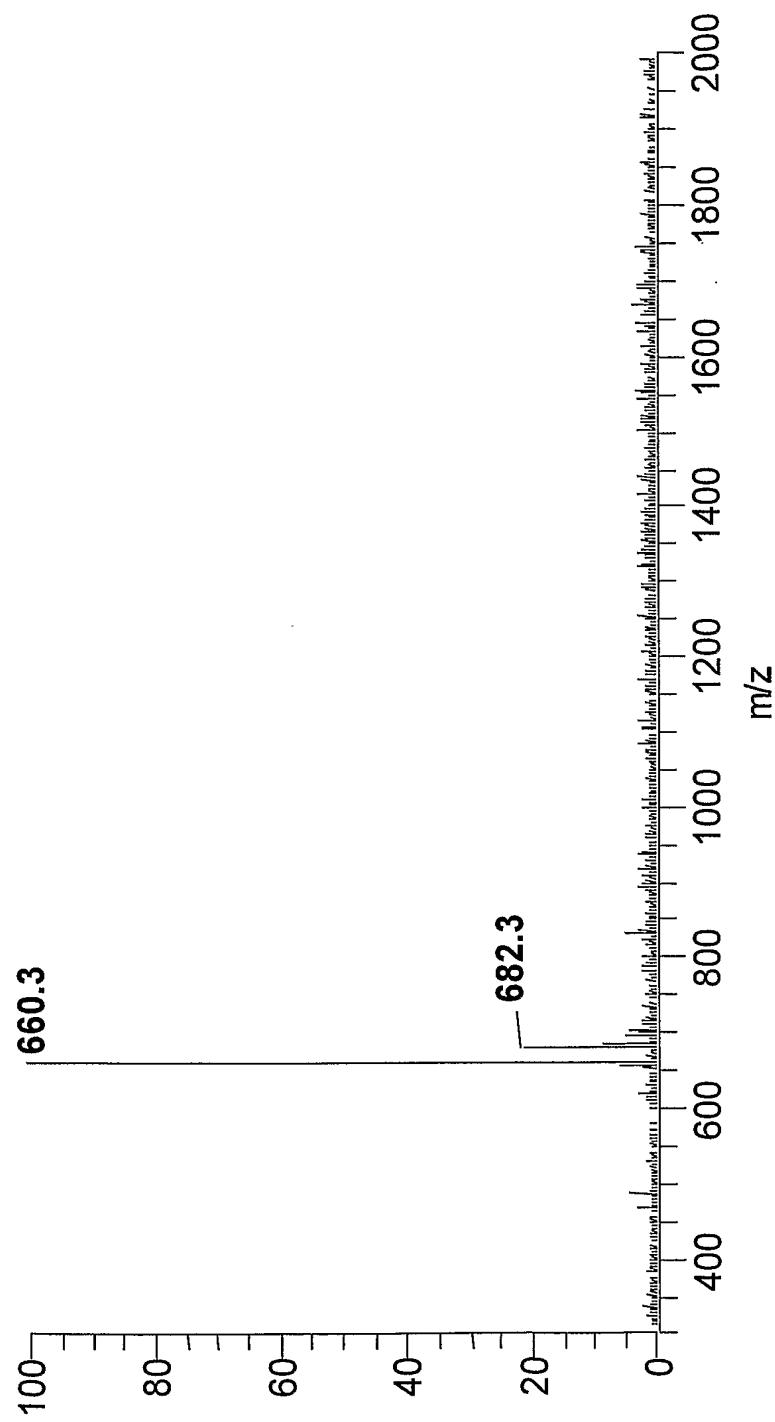


Fig. 17

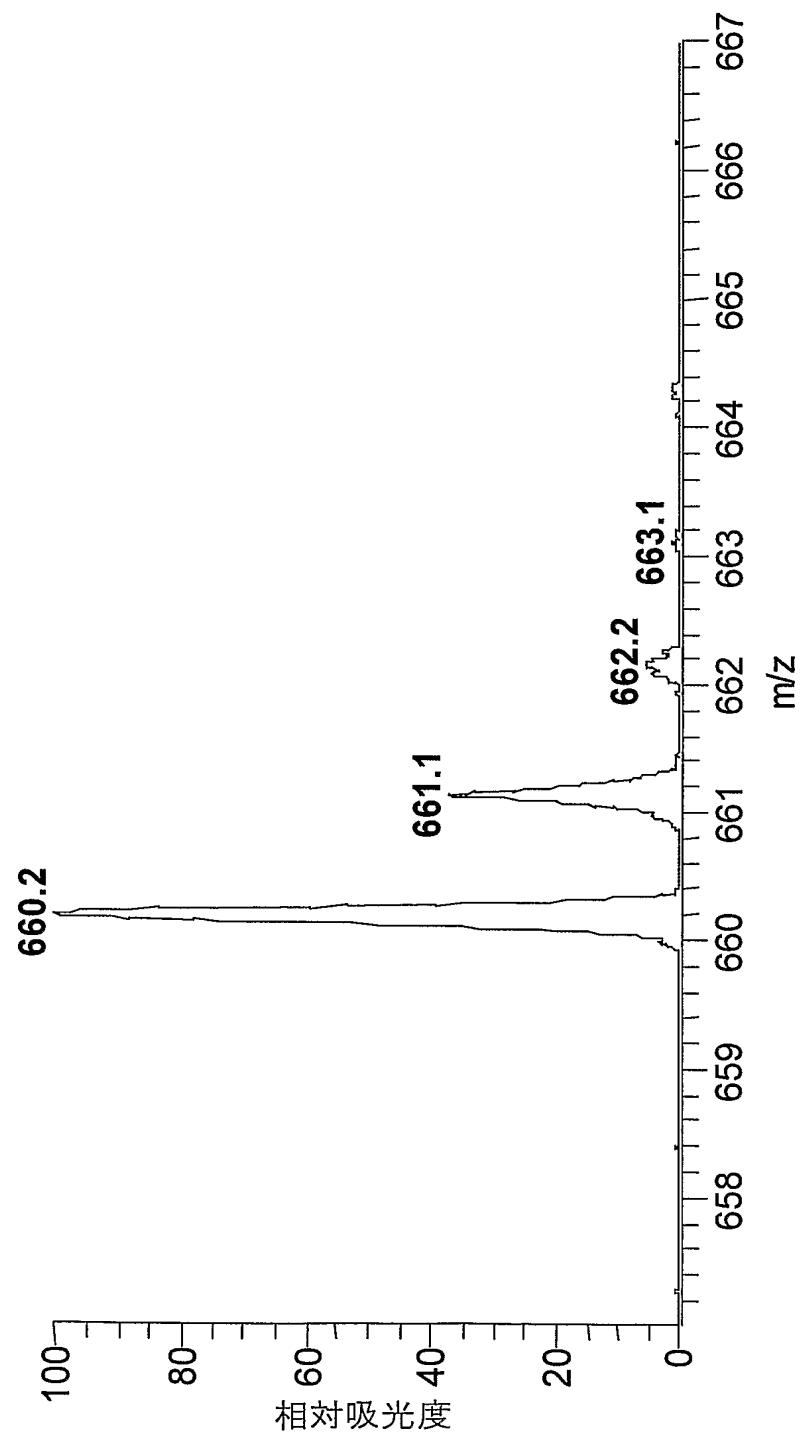


Fig.18

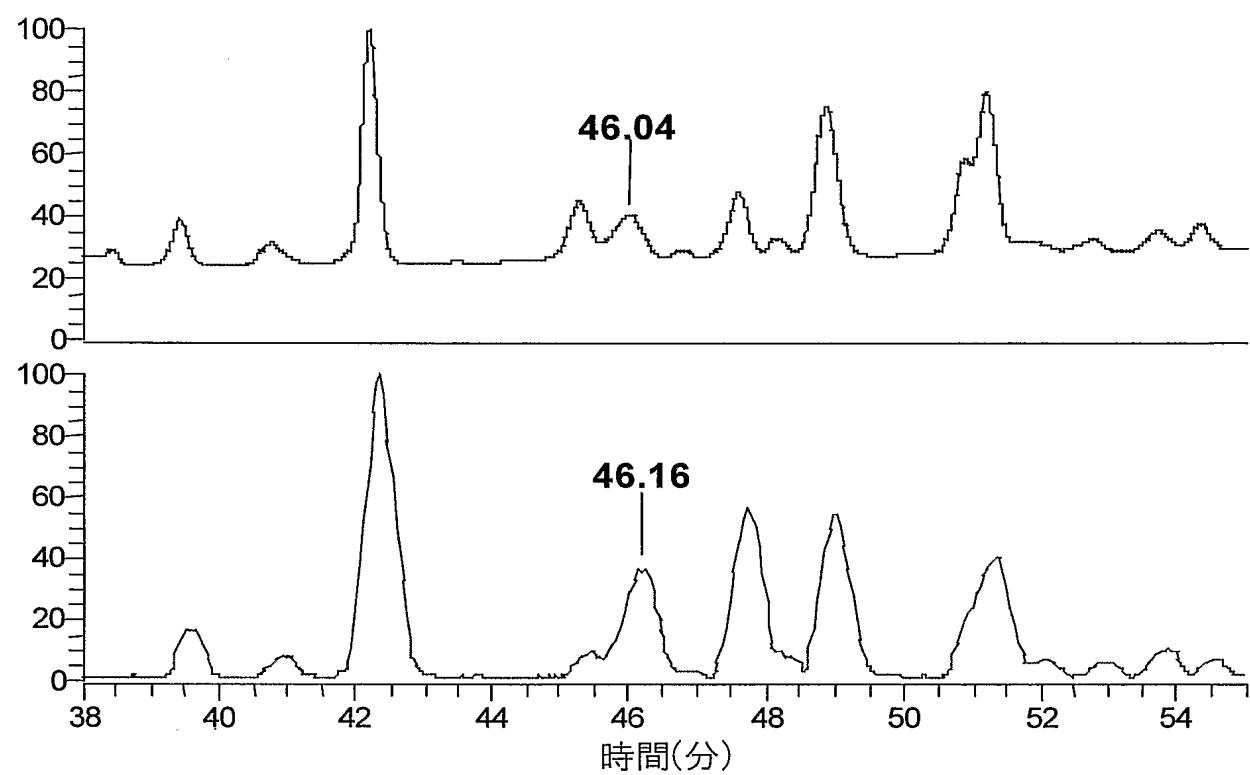


Fig. 19

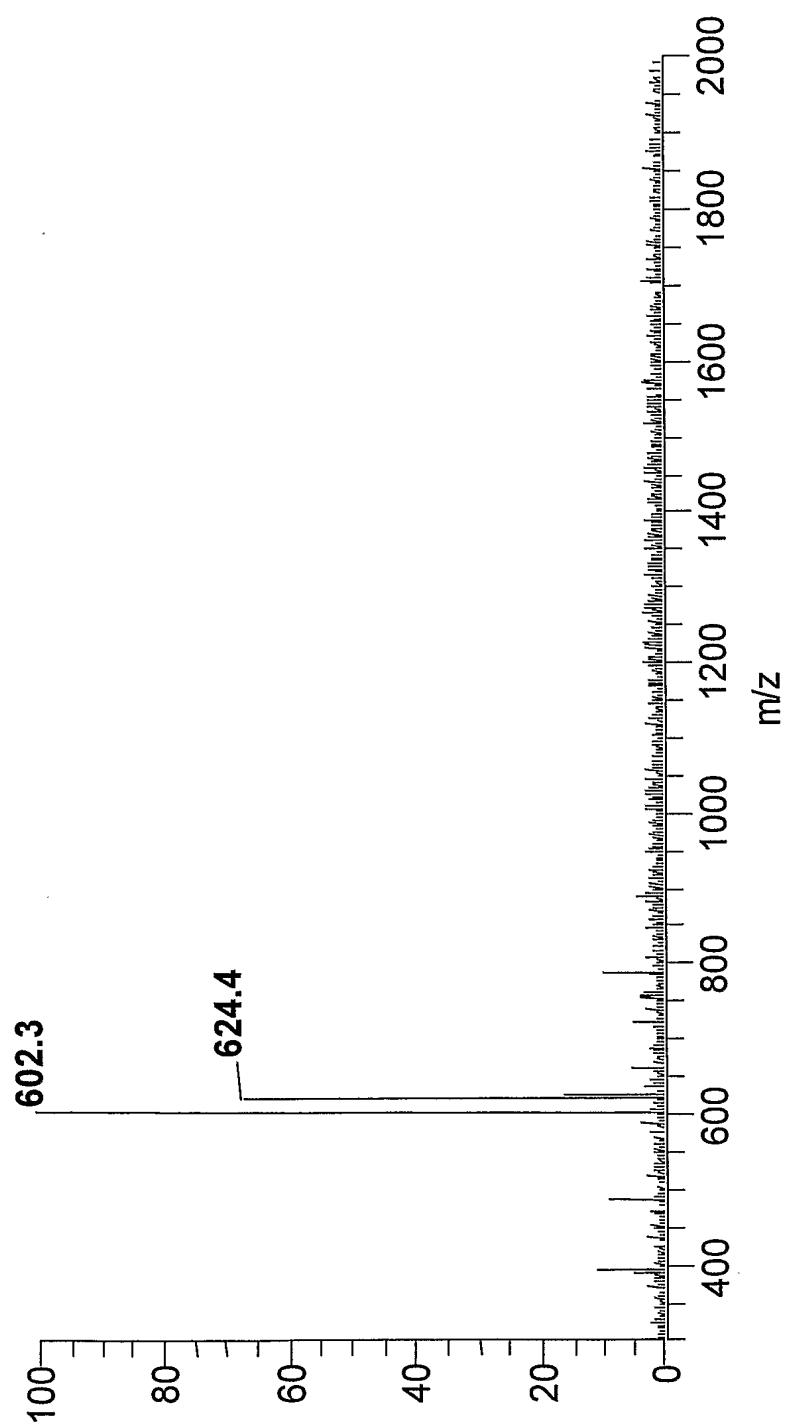


Fig. 19

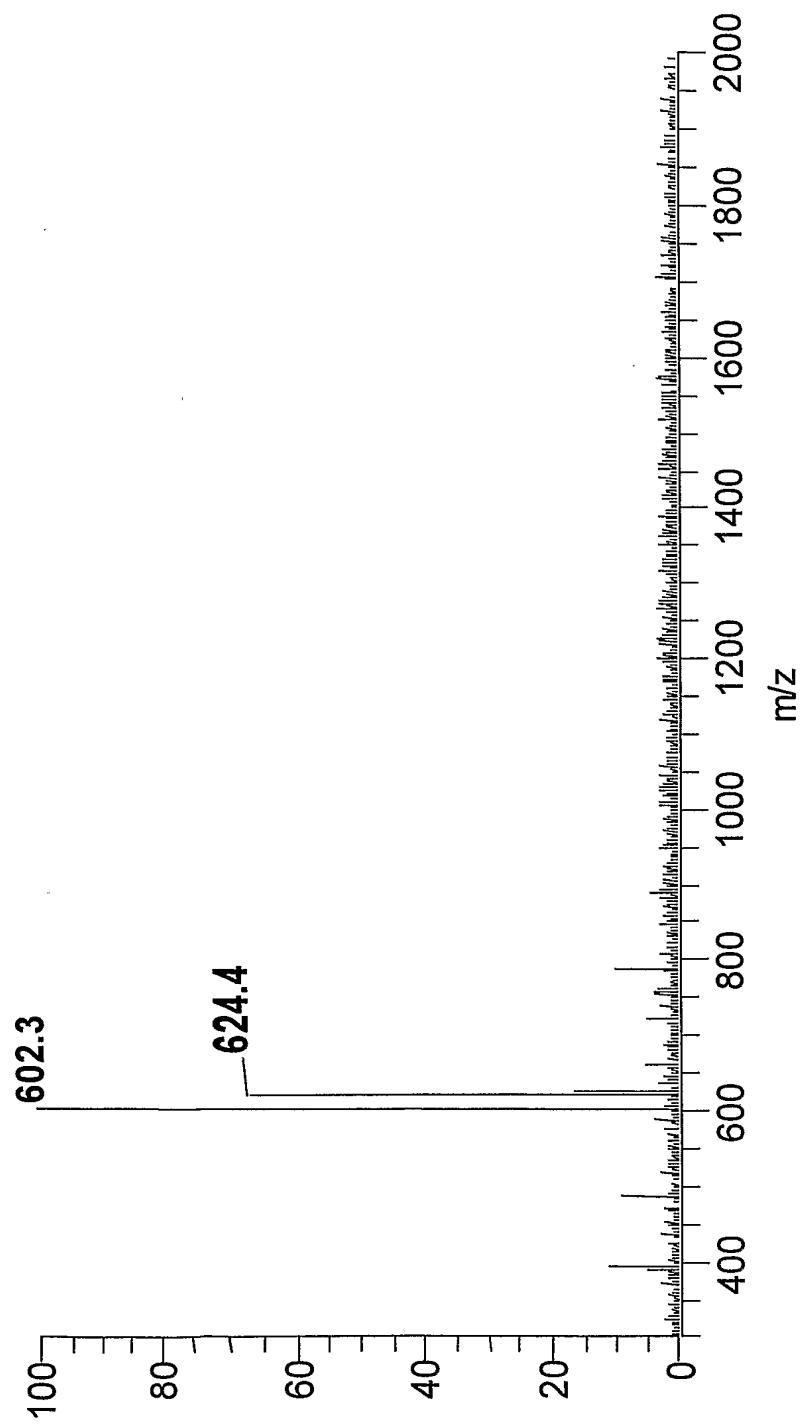


Fig. 20

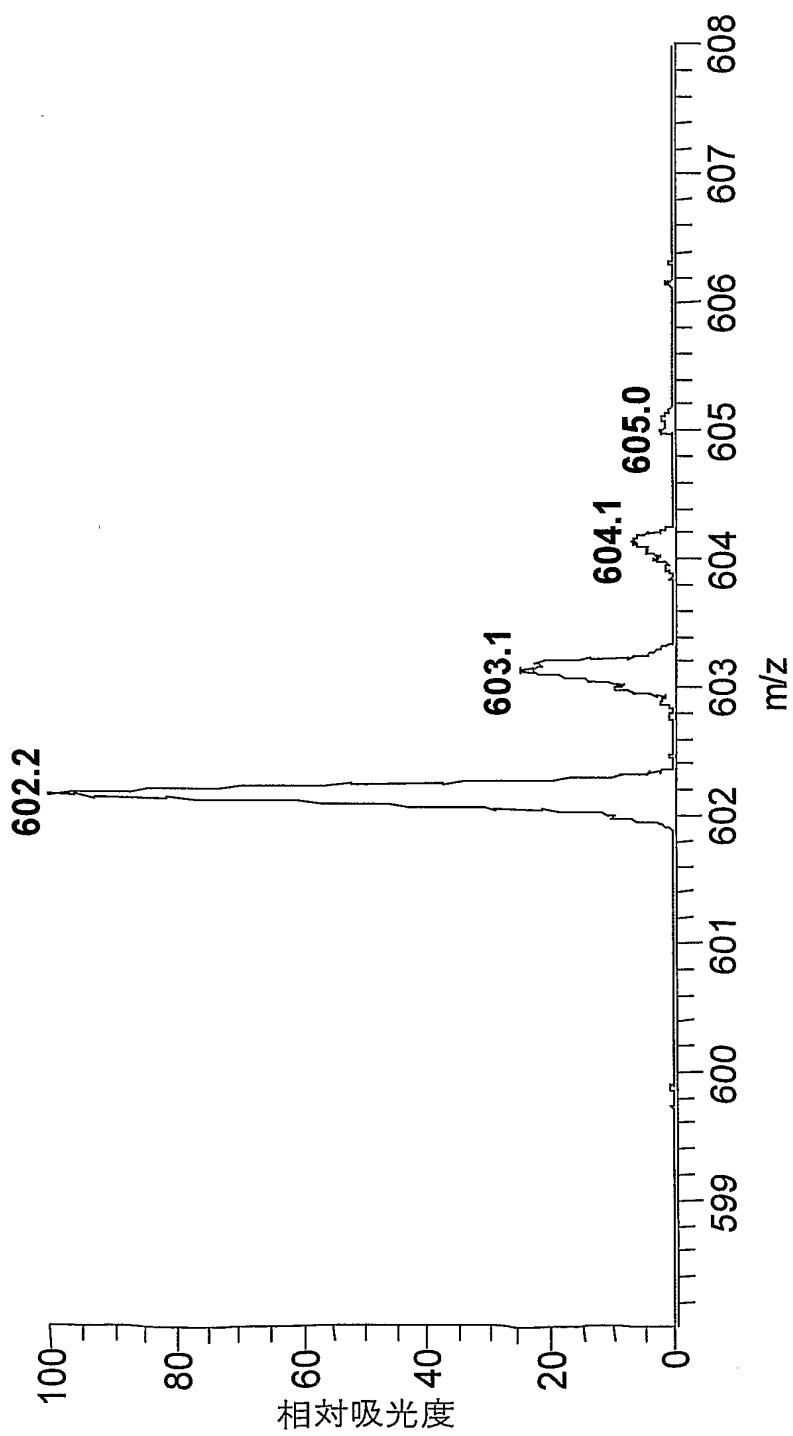


Fig.21

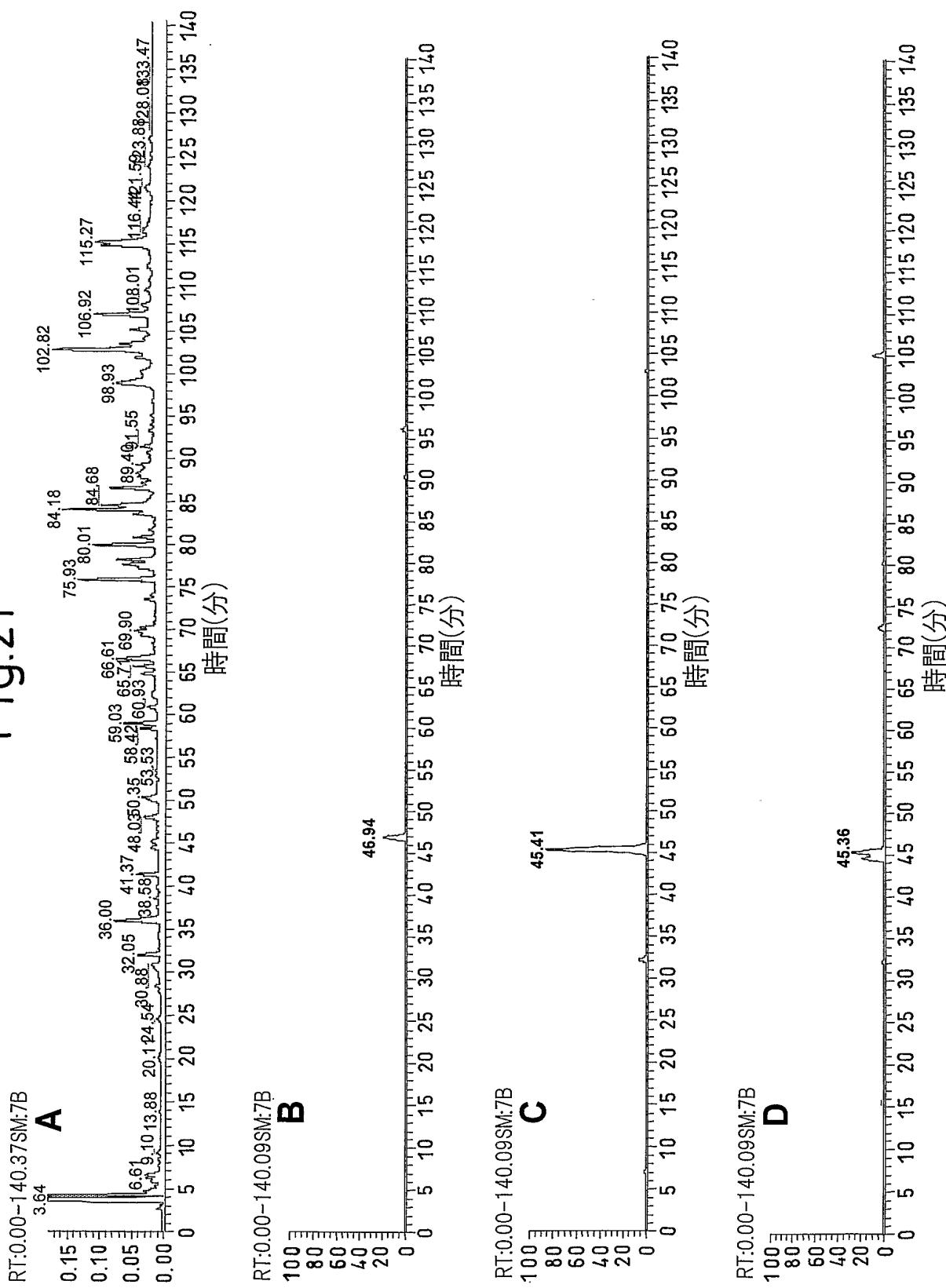


Fig. 22

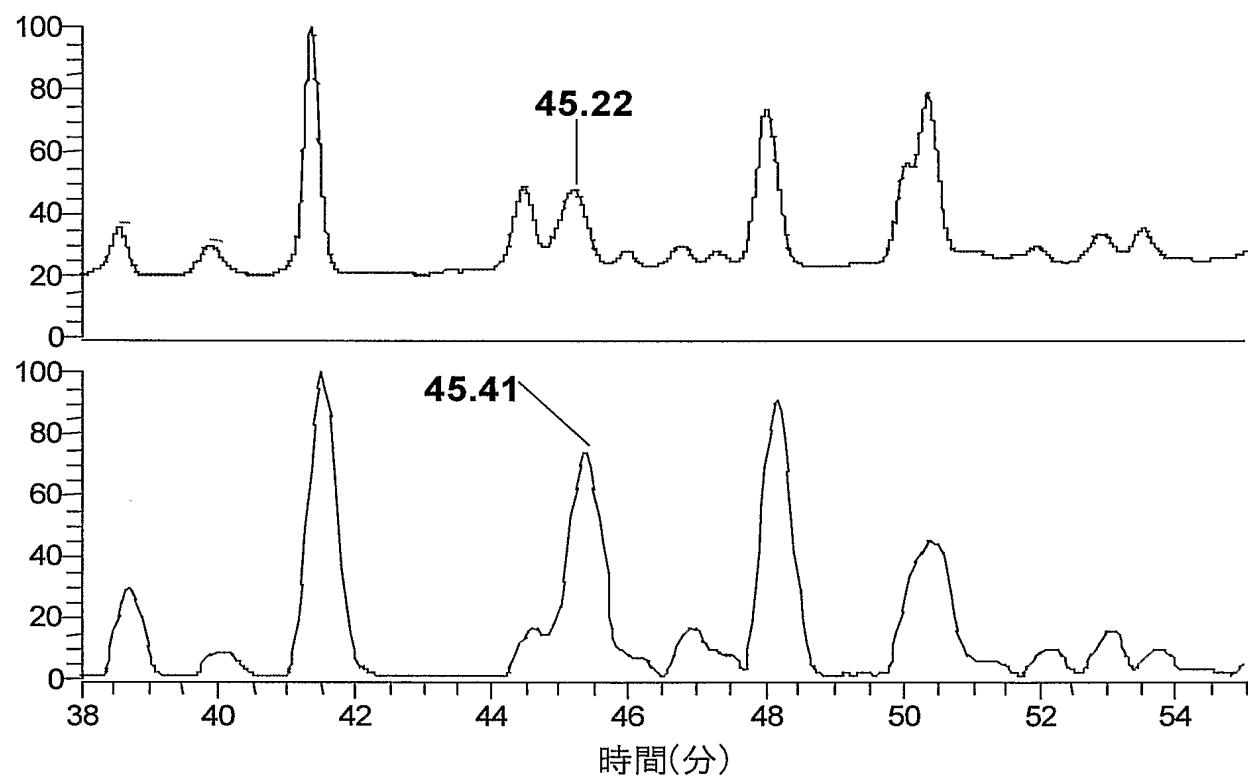


Fig.23

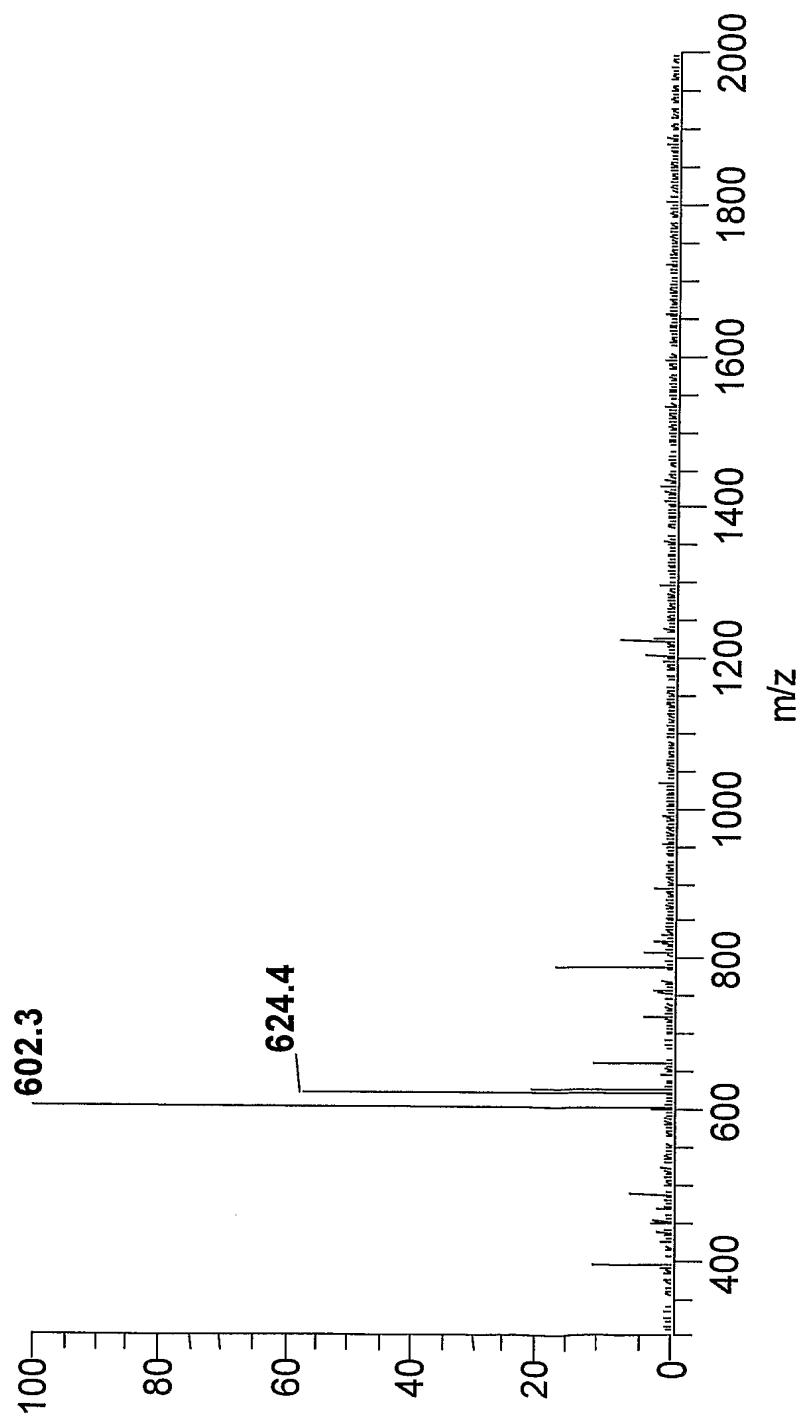
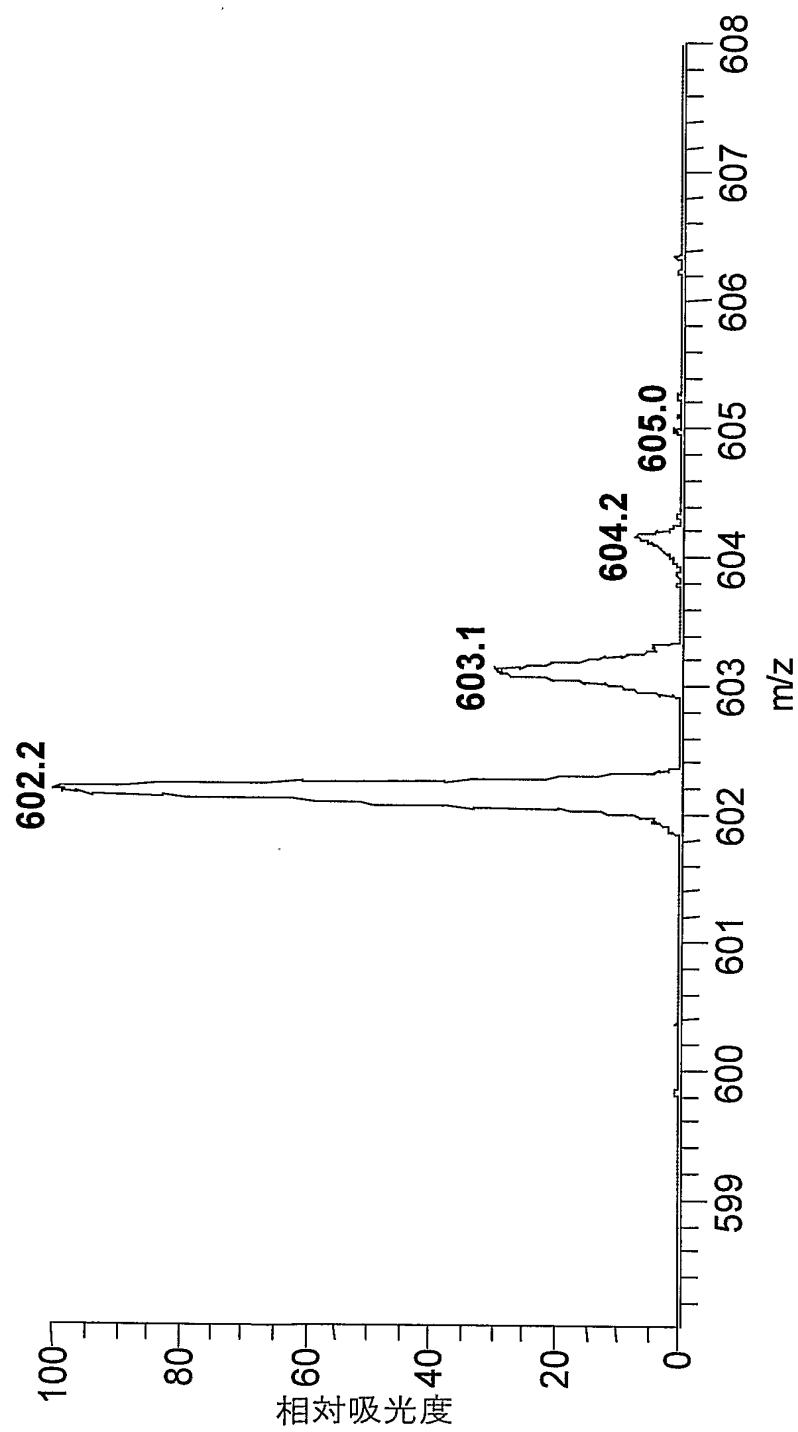


Fig. 24



## SEQUENCE LISTING

<110>Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha

<120>Subtypes of humanized antibody against interleukin-6 receptor

<130>P962

<150>JP2004-87578

<151>2004-03-24

<160>2

<210>1

<211>448

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Amino acid sequence of C chain of humanized antibody PM-1 against interleukin-6 receptor

<400>1

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln  
5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp  
20 25 30

His Ala Trp Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp  
35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu  
50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser  
65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
100 105 110

Ser Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe  
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu  
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
165	170	175	
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
180	185	190	
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro			
195	200	205	
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys			
210	215	220	
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
225	230	235	240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
245	250	255	
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
260	265	270	
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
275	280	285	
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
290	295	300	
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
305	310	315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
325	330	335	
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
340	345	350	
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
355	360	365	
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
370	375	380	
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
385	390	395	400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
405	410	415	
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
420	425	430	
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			

435 440 445

<210>2

<211>214

<212>PRT

<213>Artificial Sequence

<220>

<221>

<222>

<223>Amino acid sequence of L chain of humanized antibody PM-1 against interleukin-6 receptor

<400>2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195

200

205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006229

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/28, A61K39/395, A61P1/04, 1/18, 13/12, 17/06, 19/02, 29/00, 31/04, 31/18, 35/00, 37/02, 37/06//C12N15/09, C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K16/28, A61K39/395, A61P1/04, 1/18, 13/12, 17/06, 19/02, 29/00, 31/04, 31/18, 35/00, 37/02, 37/06//C12N15/09, C12P21/08

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 05-227970 A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 07 September, 1993 (07.09.93), Par. Nos. [0140] to [0143], [0170] to [0171] & WO 1992/019759 A1 Page 64, line 3 to page 65, line 15; example 10 & US 5795965 A1 & EP 0628639 A1	1-6
Y	JP 2002-510211 A (Genentech, Inc.), 02 April, 2002 (02.04.02), Page 77, line 14 to page 79, line 10 & WO 1999/001556 A2 & US 5994511 A1	1-6

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
19 May, 2005 (19.05.05)Date of mailing of the international search report  
07 June, 2005 (07.06.05)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K16/28, A61K39/395, A61P1/04, 1/18, 13/12, 17/06, 19/02, 29/00, 31/04, 31/18, 35/00, 37/02, 37/06  
// C12N15/09, C12P21/08

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl.<sup>7</sup> C07K16/28, A61K39/395, A61P1/04, 1/18, 13/12, 17/06, 19/02, 29/00, 31/04, 31/18, 35/00, 37/02, 37/06  
// C12N15/09, C12P21/08

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

## 国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST ファイル (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 05-227970 A (中外製薬株式会社) 1993.09.07, 段落番号【0140】-【0143】，【0170】-【0171】 & WO 1992/019759 A1, 第 64 頁第 3 行-第 65 頁第 15 行, 実施例 10 & US 5795965 A1 & EP 0628639 A1	1-6
Y	JP 2002-510211 A (ジェネンテク, インコーポレイテッド) 2002.04.02, 第 77 頁第 14 行-第 79 頁第 10 行 & WO 1999/001556 A2 & US 5994511 A1	1-6

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

19.05.2005

## 国際調査報告の発送日

07.6.2005

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官（権限のある職員）

阪野 誠司

4B 3538

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	MERKLER, et al., Recombinant type A rat 75-kDa alpha-amidating enzyme catalyzes the conversion of glycine-extended peptides to peptide amides via an alpha-hydroxyglycine intermediate, Arch. Biochem. Biophys., Vol.289, No.1, 1991.08.15, p.192-196	1-6
Y	MILLER, et al., Characterization of a bifunctional peptidylglycine alpha-amidating enzyme expressed in Chinese hamster ovary cells, Arch. Biochem. Biophys., Vol. 298, No.2, 1992.11.01, p.380-388	1-6
Y	RAY, et al., Production of salmon calcitonin by direct expression of a glycine-extended precursor in Escherichia coli, Protein Expr. Purif., Vol.26, No.2, 2002.11, p.249-259	1-6
Y	JP 2002-525104 A (スミスクライン・ビーチャム・コーポレイション) 2002.08.13, 段落番号【0123】 & WO 2000/018804 A1 & US 6365154 B1	1-6
Y	JP 06-319396 A (日本たばこ産業株式会社) 1994.11.22, 段落番号【0028】 (ファミリーなし)	1-6
Y	ADAMCZYK, et al., Complete sequencing of anti-vancomycin fab fragment by liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry with a combination of database searching and manual interpretation of the MS/MS spectra, J. Immunol. Methods, Vol.260, No.1-2, 2002.02.01, p.235-249	1-6
A	HIRATA, et al., Characterization of IL-6 receptor expression by monoclonal and polyclonal antibodies, J. Immunol., Vol.143, No.9, 1989.11.01, p.2900-2906	1-6